Novagen

pET System Manual

タンパク質発現システム第10版 日本語版

The Gold Standard for Protein Expression

Advancing your life science discoveries™

MERCK

目次

目次 1
I. 本システムについて 4
A. 説明 4
B. ライセンシングおよび使用協定 4
C. システム構成内容 4
D. pETベクターの選択 5
まず始めに考えること 5
可溶性と細胞内局在 6
融合タグ 6
pETベクター特性表 8
E. pETベクターのクローニングストラテジー 9
融合タグなし天然タンパク質の生産 9
プロテアーゼ処理後の融合タグなし天然タンパク質の生産 10
LIC（LIGATION INDEPENDENT CLONING）クローニング 10
F. pETシステムによるタンパク質発現の制御 11
T7lac プロモーター 11
pLysSおよびpLysE宿主 11
発現レベルに影響を及ぼすベクターと宿主の組合わせ 12
グルコース含有培地 12
pLacI宿主 13
pETcocoシステム 13
G. クローニング用宿主 13
H. 発現用宿主 14
プロテアーゼ欠損株 14
培養液中における全細胞の発現量調整 15
ジスルフィド結合の形成および可溶性の向上 15
使用頻度の低いコドンの補充 15
セレノメチオニン標識 15
pETシステム宿主株の特性 16
I. 抗生物質耐性 18
J. バクテリオファージ　CE6 18
K. 誘導コントロール株 19
II. 始めるにあたって 20
A. pETシステムの手順 20
B. 増殖培地 21
C. 菌株の保存 22
D. ベクターの調製 23
E. インサートの調製 24
III. pETベクターでのインサートのクローニング 25
A. ライゲーション 25
B. 形質転換 25
取り扱い上の留意点 26
操作 26
プレーティング法 27
C. pET組換え体の分析 28
EcoProを用いたpET 組換え体の転写/翻訳分析 28
プラスミドテンプレート 29
PCRテンプレート 29
ライゲーションPCRによる転写/翻訳分析用テンプレートの作製 30
コロニーPCRによる転写/翻訳分析用のテンプレートの作製 30
コロニースクリーニング 32
プラスミドDNAの少量調製法(ミニプレップ) 32
シークエンシング 32

IV. 目的遺伝子の発現 33
A. 発現用宿主の形質転換 33
B. λDE3溶原菌の発現誘導 33
誘導前の準備 33
誘導プロトコールの例 33
V. 発現の最適化 34
A. 可溶性およびフォールディングの促進 34
温度 34
溶解バッファー 34
ペリプラズム局在 35
細胞質局在 35
ホスト株 36
B. 使用頻度の低いコドンの補正 36
C. 毒性遺伝子とプラスミドの不安定性 37
アンピシリンの使用 37
グルコースの補給 38
プラスミド安定性試験 38
グリセロールストック保存のための
amp^R pETベクター内の毒性遺伝子安定化 39
誘導時のamp^R pETベクター内毒性遺伝子安定化 39
D. 発現に影響を与える他の因子 40
Nエンドルール 40
セカンドサイトからの翻訳開始 40
mRNAの二次構造 41
予想外の停止コドン 41
転写の終結 41
目的とするmRNAおよびタンパク質の不安定性 41
VI. 目的タンパク質の確認 42
SDS-PAGEにおけるローディング容量の標準化 42
増殖および誘導 42
誘導培養液のOD測定 42
A. 発現レベル、活性、可溶性分析ためのPopCultureによる
迅速なスクリーニング 43
B. 全細胞タンパク質(Total Cell Protein)画分 43
C. 培地画分 44
D. ペリプラズム画分 45
E. 可溶性細胞質画分 46
BugBusterおよびBenzonase Nuclease処理 46
rLysozyme Solutionおよび凍結／融解処理 47
機械的破砕 48
F. 不溶性画分 49
BugBuster処理後の封入体精製 49
機械的破砕後の封入体精製 49
G. PopCulture Reagentを用いた抽出液の調製 50
VII. 目的タンパク質の検出と定量 51
A. SDS-PAGEゲルへのサンプルのアプライ(補正アプライ量) 51
B. 融合タグによる検出/アッセイツール 52
VIII. 目的タンパク質の精製 53
A. 精製ツール 54
B. 可溶化およびタンパク質の再生 56
IX. 誘導コントロール:β-ガラクトシダーゼ組換え体 57
β-ガラクトシダーゼ測定法 57
X. 謝辞 58

XI. 参考文献 58
XII. 索引 61
XIII. 学術および非営利的な研究施設に関する確認書 64
XIV. 大腸菌株の取決め 64
XV. 付録：pETシステムの大腸菌株とラムダファージ 65
タンパク質発現用λDE3溶原菌 65
クローニング、コントロール、発現用非溶原菌 67
pET大腸菌株のコンピテントセルセット 68
pETシステムλファージ 68

Copyright®1992-2002 by Novagen, Inc. All rights reserved.
* patent pending
BetaRed, BugBuster, CBDoTag, ColiRollers, Clonables, DsboTag, EcoPro, EKapture, EXlox, FRETWorks, GSToBind, GSToMag, GSToTag, HisoBind, HisoMag, HisoTag, HSVoTag, LumiBlot, Mobius, NovaTaq, NovaTope, NusoTag, Origami, Pellet Paint, Perfect DNA, Perfect Protein, pETBlue, pETcoco, PopCulture, pSCREEN, RoboPop, Rosetta, RosettaBlue, Rosetta-gami, SoTag, Single Tube Protein, Singles, SpinPrep, STP3, Strandase, T7oTag, Trail Mix, TriEx, TrxoTag, Tuner, UltraMobius, Xarrest, the Novagen name and logo are trademarks and registered trademarks of Novagen, Inc. Superflow is a trademark of Sterogene Bioseparations Inc. Fractogel and Benzonase are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. MagPrep is a trademark of EM Industries Inc. CBIND is a trademark of CBD Technologies, Inc. Triton is a trademark of Rohm and Haas Co. Bacto is a trademark of Difco, Inc.

The pET system is covered by U.S. Patent no. 4,952,496. A non-distribution agreement accompanies the products. Commercial customers must obtain a license agreement from Brookhaven Science Associates before purchase. The pET-32 vectors are sold under patent license from Genetics Institute, Inc. For research use only. Licenses for commercial manufacture or use may be obtained directly from Genetics Institute, Inc., 87 Cambridge Park Drive, Cambridge, MA 02140. The CBD Tag technology is covered under U.S. Patent nos. 5,496,934; 5,202,247; 5,340,731; and 5,137,819. Use of this technology for commercial purposes requires a license from CBD Technologies, Inc. Ni-NTA HisoBind Resins are manufactured by QIAGEN GmbH. HisoTag Monoclonal Antibody is covered under German Patent No. DE 19 507 166 and international patent applications are filed under W09626963 and is provided only for use in research. Information about licenses for commercial use is available from QIAGEN GmbH, Max-Volmer-Str-4, D-40724 Hilden, Germany. The GST Tag technology is covered under U.S. Patent no. 5,654,176, European Patent No. 293,249B1, and Australian Patent No. 607,511. Vectors containing the HisoTag sequence are licensed under U. S. Patent Nos. 5,310,663;5,284,933; and European Patent No. 282,042 issued to Hoffmann-La Roche, Inc., Nutley NJ and/or Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Switzerland and are provided only for use in research. Information about licenses for commercial use is available from QIAGEN GmbH, Max-Volmer-Str. 4, D-40724 Hilden, Germany. The HisoTag1 Antibody is covered by patent DE 195 07 166 and international patent applications are filed under W09626963 and is provided only for use in research. Information about licenses for commercial use is available from QIAGEN GmbH, Max-Volmer-Str-4, D-40724 Hilden, Germany. NovaTaq and KOD DNA Polymerases are sold under licensing arrangements with F. Hoffmann La-Roche Ltd., Roche Molecular Systems, Inc. and PE Corporation. KOD DNA Polymerases are manufactured by TOYOBO and distributed by Novagen, Inc. KOD products are not available through Novagen in Japan. KOD XL DNA Polymerase is licensed under U.S. Patent No. 5,436,149 owned by Takara Shuzo, Co., Ltd. Purchase of KOD or NovaTaq DNA Polymerases is accompanied by a limited license to use it in the Polymerase Chain Reaction (PCR) process in conjunction with a thermal cycler whose use in the automated performance of the PCR process is covered by the up-front license fee, either by payment to Applied Biosystems or as purchased, i.e., an authorized thermal cycler.

Novagen is a brand of CN Biosciences, Inc., an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
All Novagen products are sold for research use only

I. 本システムについて

A. 説明

pET Systemは，大腸菌を使った組換えタンパク質のクローニング・発現系で，この種のシステムとしては現在もっとも優れた製品です．目的遺伝子は，pETプラスミド内の強力なバクテリオファージT7転写・翻訳（任意）シグナルの支配下にクローニングされます．発現は，宿主菌体にT7 RNAポリメラーゼ源を加えることにより行います．T7 RNAポリメラーゼは，選択性と活性がきわめて高いため，発現誘導を充分に行うと，菌体内のほぼすべての関連物質が目的遺伝子の発現に振り向けられることになります．目的の発現産物は，誘導後わずか数時間で菌体内の総タンパク質の50%以上に達します．本システムはきわめて強力ですが，誘導物質の濃度を下げるだけで発現レベルを抑えることも可能です．タンパク質によっては，発現レベルを抑制することで可溶性画分の収量が増すものもあります．本システムのもう1つの重要な利点は，非誘導時には目的遺伝子の転写を完全に抑制できる点です．まず，T7 RNAポリメラーゼ遺伝子をもたない宿主で目的遺伝子のクローニングを行うため，宿主菌体に対して毒性を示す可能性のあるタンパク質の産生によってプラスミドが不安定となる恐れがありません．詳細はI.F項を参照してください．非発現宿主でプラスミドを構築したのち，発現宿主に λCE6（ λp_Lおよび p_Iプロモーターの支配下にT7 RNAポリメラーゼ遺伝子をもつファージ）を感染させること，あるいは *lacUV5* の支配下にT7 RNAポリメラーゼ遺伝子の染色体コピーをもつ発現宿主にプラスミドを導入することにより，目的タンパク質の発現を開始させます．後者の場合，大腸菌培地にIPTGを添加することにより発現を誘導します．毒性のないタンパク質などの場合，発現宿主にそのままクローニングできますが，一般的な方法としてはお勧めできません．2種類のT7プロモーターと，基底発現レベルの抑制制御の強さが異なる数種の宿主を利用できるため，多様な目的遺伝子の最適な発現に，柔軟に対応することが可能です．

すべてのpETベクターおよび関連製品は，目的タンパク質のクローニング，発現，検出，精製が簡便に行うことのできるキットとしてご提供しています．pETシステムには，プラスミドベクターと宿主が含まれています．「システム構成内容」の後に記載されている基礎情報は，お客様の用途に最適なベクターと宿主の組合わせを決める際の参考になるでしょう．

B. ライセンシングおよび使用協定

T7 RNAポリメラーゼ遺伝子をもつ大腸菌，ファージ，プラスミドを含め，本T7発現システムは，「学術および非営利的な研究施設に関する確認書」に記載の条件のもとで使用することが可能です．本マニュアルの64ページまたはご購入のキットに付属の書面に記載されている条件リストを参照してください．

C. システム構成内容

pET Expression Systems には，目的遺伝子のクローニングと発現に必要な主要試薬が含まれています．

- pETベクターDNA，表示のプラスミドを各10 µg
- 宿主菌株BL21，BL21(DE3)，BL21(DE3)pLysSのグリセロールストック[1,2]
- 誘導コントロールクローン，グリセロールストック

[1]pET Peptide Expression System 31では，BL21系宿主の代わりにBLRおよびBLR(DE3)pLysS宿主株が含まれています．

[2]pET Trx Fusion System 32では，BL21系宿主に加えてOrigami系の宿主株も含まれています．

Systems plus コンピテントセルには，pET組換え体の高効率な形質転換を可能とする3種類の宿主株が含まれています．これらのキットには下記製品も同梱されており，各宿主においてそれぞれ10回の形質転換を行うのに充分な量が含まれています．

- 試験済みのコンピテントセルとして，NovaBlue，BL21(DE3)，およびBL21(DE3)pLysSの宿主を各0.2 ml
- SOC培地
- Test Plasmid

単品および関連製品：カタログ又はウエブサイトを参照してください．

D. pETベクターの選択

pETベクターは，Studierら (Studier and Moffatt, 1986; Rosenberg et al., 1987; Studier et al., 1990) によって最初に作製されました．Novagenが開発した新しいpET誘導株は，目的タンパク質のサブクローニング，検出，精製を容易に行うことのできる優れた特徴をもつています．使用できるベクターには，大きく分けて2種類の転写ベクターと翻訳ベクターを御利用いただけます．

●転写ベクターは，それ自身の原核リボソーム結合部位とATG開始コドンをもつ目的遺伝子の発現用として設計されたものです．転写ベクターは次の3種類です：pET-21(+)，pET-24(+)，pET-23(+).

●翻訳ベクターは，ファージ T7主要キャプシドタンパク質由来の高効率のリボソーム結合部位をもっているので、リボソーム結合部位をもたない目的遺伝子の発現に使われています．

翻訳ベクターと転写ベクターの名称は，名前の末尾の文字で区別することができます．たとえば，pET-21a(+)は，*Bam*H Iクローニング部位認識配列GGATCCに対するリーディングフレームを意味します．末尾に“a”が付いているベクターはいずれも*Bam*H I 認識配列のGGAトリプレットから発現を開始し，末尾に“b”が付いているベクターはGATトリプレットから，末尾に“c”が付いているベクターはATCトリプレットから発現を開始します．末尾に“d”が付いているベクターは“c”フレームから発現しますが，目的遺伝子をATG開始コドン内に直接挿入できるようにするために，この系統では上流に*Nde* Iクローニング部位の代わりに*Nco* Iクローニング部位をもたせてあります．

まず考察すべき事項

いくつかの因子を考慮した上で，発現に用いるpETベクターを選択します．次の3つの基本因子について考慮してください．

・発現させたタンパク質の用途

・発現させたタンパク質に特有の既知の情報

・クローニング方法

pETベクターで発現させたタンパク質の用途は，非常に多岐に渡っています．例えば，活性測定，変異体のスクリーニングと評価，リガンド相互作用のためのスクリーニング，抗原作製のためには，目的タンパク質の分析に必要な量が求められる場合があります．構造解析，試薬としての使用，またはアフィニティーマトリックス作製には，大量の活性タンパク質が必須となる場合もあります．スクリーニングや抗原作製に必要な量のタンパク質を発現させるには, 多数のベクターが適しているかもしれませんが，ベクター，宿主株，培養条件のある1つの組合わせだけが，大規模での精製に最も効率的なこともあります．継続的に活性タンパク質が高収率で必要な場合には，最適な結果を見つけるために，ベクター，宿主，培養の一連の条件検討をする価値があります．

次に目的タンパク質に関しての既知情報は，ベクターを選択する際の参考になります．例えば，タンパク質の中には，その片端または両端に不要な配列があると活性を示さないものもあります．ほとんどのpETベクターにより，非融合配列のクローニングが可能です．しかし，大腸菌内で特定の翻訳開始配列が有効に利用されない場合には，発現レベルが影響を受ける可能性があります．この場合には，効率よく発現するアミノ末端配列(8ページ，「*pETベクターの特性の表*」に，Nで示してあります)を含む融合タンパク質を構築してから精製します．プロテアーゼにより部位特異的に切断し，融合パートナーを除去するという選択肢があります．この手法には，LIC（Ligation-independent cloning）法が特に有効で，エンテロキナーゼまたはFactor Xaを用いてベクターに由来する全てのアミノ末端配列を除去できます（8ページ，「*pETベクターの特性の表*」に示してあります）.

最後に，制限酵素部位とリーディングフレームとが適合する必要があるため，クローニング方法によりベクターを選択します．多くのpETベクターの制限酵素部位は共通なので，通常，1度のインサートの作製で，目的遺伝子をいくつかのベクターにクローンすることが可能です．PCRクローニング法を用いる場合には様々な検討が必要ですが，この目的には，LICベクターキットを推奨しております．このキットにより，PCRによるインサートの作製が可能になり，ベクターやインサートの制限酵素分解の必要性がなくなります．

溶解性および細胞内局在

用途およびクローニング方法を検討したら，どのような発現を計画する場合でも，まず目的タンパク質の細胞内局在および溶解性を明らかにすることから始めるのが適しています．多くの用途の場合，可溶性で活性をもつタンパク質を発現することが望まれます．個々の目的タンパク質の溶解性は，各々のタンパク質配列等の多くの要因によって決まります．多くの場合，溶解性は全か無かの現象ではありません．ベクター，宿主，培養の条件によって，得られる可溶性画分と不溶性画分との比率が増減します．

適切なベクターおよび発現用宿主の選択により，可溶性画分にある目的タンパク質の活性および収量が顕著に増加します．以下3つの方法いずれかにより，ベクターは，可溶性とフォールディングの，両方または一方を促進します．1）高可溶性のポリペプチドとの融合［グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)，チオレドキシン(Trx)，N utilization substance A (NusA)等］，2）ジスルフィド結合の形成を触媒する酵素との融合（チオレドキシン，DsbA，DsbC等），3）ペリプラズムへの移行シグナル配列の付与．細胞質発現用のベクターを用いると，細胞質内でのジスルフィド結合形成に許容性のある宿主ではフォールディングが改善されます．（*trx*Bおよび*gor*変異株，15ページ参照）

活性をもち可溶性のタンパク質を得るには，ペリプラズムへの移行を可能にするベクターを使用するという方法もあります．ペリプラズムはジスルフィド結合の形成により適した環境です．この目的には，シグナルペプチドをもつベクターが用いられます．DsbAおよびDsbCは，pET-39b(+)，pET-40b(+)のそれぞれでジスルフィド結合形成や異性化を触媒するペリプラズム酵素です．DsbAまたはDsbCコード領域を除いたシグナル配列のみをもつ，pETベクターもご用意しております．8ページの表を参照してください.

多くの場合，目的タンパク質は，封入体（inclusion body）として知られる不溶性かつ不活性凝集体として蓄積します．封入体は，場合によっては精製に好都合です．理由として，1）遠心操作により容易に単離でき，高濃度の比較的純度の高いタンパク質が得られること，2）封入体構造によって目的タンパク質がタンパク質分解酵素から守られることが挙げられます．さらには，毒性タンパク質も，封入体として不活性の形態をとっている限りは細胞増殖を阻害しません.

精製方法によっては，細胞質での不溶性封入体の産生を最適化します．封入体を抽出して可溶化し，その後*in vitro*で目的タンパク質を再生(リフォールド)します．この手法により，通常，最高収量の初期タンパク塊が産生され，宿主細胞でのタンパク質分解が防げます．しかし，活性をもつタンパク質への再生効率はタンパク質ごとに異なっており，非常に低い場合もあります．そのため，抗原作製や，適切なフォールディングを必要としない用途の場合に，この方法がよく用いられます．pET-17xbは，N末端融合配列として完全な220アミノ酸T7*gene10*タンパク質を発現し，封入体を産生する典型的な例です．また，pET-31b(+)は，不溶性融合タンパク質を産生するために特別に設計されており，小さなサイズのタンパク質やペプチドの産生に非常に有効です.

融合タグ

融合タグは，目的タンパク質の検出および精製を容易にし，細胞質内での可溶性やペリプラズムへの移行に関与することで活性の発現率を高めます．目的とする用途に融合配列を用いることができる場合には，ウエスタンブロッティングで簡便に検出できる，S・Tag，T7・Tag ，GST・Tag ，His・Tag，または HSV・Tag，Nus・Tagをもつ融合タンパク質を産生するのが有効です．これらのペプチド（融合配列）のうちいくつかはサイズが小さく，これらの検出試薬は極めて特異的で高感度です．His・Tag，GST・Tag，S・Tag，T7・Tagは，対応するレジンおよびバッファーキットを用いることにより，アフィニティー精製に利用できます.

S・Tag Assay KitおよびGST・Tag Assay Kitを用いることにより，粗抽出液中または精製後の融合タンパク質量を正確に定量できます．FRETWorks S・Tag Assay Kitには，均一系において1fmol以下の融合タンパク質に対する蛍光検出が可能な新規基質を利用しています.

His・Tagは，一般的にタンパク質精製の融合パートナーとして非常に有用です．タンパク質を可溶化させる完全な変性条件下でもアフィニティー精製を行うことができるため，最初に封入体として発現するタンパク質の場合には特に有用です.

CBD・Tagは，一般的に低コストアフィニティー精製にも有効です．再生プロトコール［特に，

CBD$_{clos}$・Tagをもつ[pET-34b(+)とpET-35b(+)]にも非常に適しています．正しくフォールドしたCBDのみがセルロースマトリックスに結合するので，CB$_{IN}$Dアフィニティー精製法は，不適切にフォールドした分子を試料から除去することができます．多くのタグが目的タンパク質を固定化するのに使用できますが，CBD・Tagは，セルロースマトリックスへの非特異的結合性および生体適合性が潜在的に低いため，この目的に最適です．

Nus・Tag，Trx・Tag，GST・Tagが，融合パートナーの可溶化を促進することが報告されています．アンピシリン耐性のあるNus・TagベクターおよびTrx・Tagベクターは，Origami，Origami B，Rosetta-gamiおよびRosetta-gami B宿主株と適合します．これらの宿主株は，細胞質でのジスルフィド結合形成を促進します．15ページを参照してください．

利用可能な種々の融合タグおよび対応するベクターを下表に記載しました．多くのpETベクターが，5'融合パートナーとしていくつかの融合タグを併せもっています（8ページを参照してください）．さらに，多くのベクターが，異なるペプチドタグを各末端にもつ融合タンパク質を発現できます．5'タグと目的配列との間にプロテアーゼ切断部位（トロンビン，Factor Xa，エンテロキナーゼ）のあるベクターを用いることで，精製後に1個以上のタグを選択的に除去することが可能になります．ただし，C末端の融合タグの発現には，(1) インサート内に停止コドンがないこと，(2) クローニングの連結部でリーディングフレームが適切に続いていることが必須であることに注意してください．

Fusion Tags Available for pET Constructs

Tag	N/C Terminal or Internal (I)	Size (aa)	Basis for Detection and/or Purification	Applications	pET Vector Series
T7•Tag®	N, I	11 or 260	monoclonal antibody	AP, IF, IP, WB	3, 5, 9, 11, 17 17x, 21, 23, 24, 28, 33
S•Tag™	N, I	15	S-protein (104aa) affinity	AP, QA, WB	29, 30, 32, 34–37, 39–44
His•Tag®	N, C, I	6, 8, or 10	metal chelation chromatography (native or denaturing) monoclonal antibody	AP, IF, WB	14–16, 19–44
HSV•Tag®	C	11	monoclonal antibody	IF, WB	25, 27, 43.1, 44
pelB/*ompT*	N	20/22	potential periplasmic localization	PE	12, 20, 22, 25, 26, 27
KSI	N	125	highly expressed hydrophobic domain	PP	31
Trx•Tag™	N	109	thioredoxin promotes disulfide bond formation – especially in *trxB* and *trxB*/*gor* hosts	DB, SP	32
PKA site	I	5	protein kinase A recognition site	PS	33
CBD$_{clos}$•Tag	N	156	polyclonal antibody, cellulose binding domain	IP, AP, WB	34, 35
CBD$_{cenA}$•Tag	N	114	polyclonal antibody, cellulose binding domain, periplasm/media	IP, AP, PE, WB	36, 37
CBD$_{cex}$•Tag	C	107	polyclonal antibody, cellulose binding domain, periplasm/media	IP, AP, PE, WB	38
Dsb•Tag™	N	208 (DsbA) 236 (DsbC)	potential periplasmic localization	DB, DI, PE, SP	39, 40
GST•Tag™	N	220	monoclonal antibody, enzymatic activity, glutathione affinity	AP, IF, IP, QA, WB	41, 42
Nus•Tag™	N, I	495	promotes cytoplasmic solubility-monoclonal antibody	SP, WB	43.1, 44

AP = affinity purification
DB = disulfide bond
DI = disulfide bond isomerization
IF = immunofluorescence
IP = immunoprecipitation
PE = protein export
PP = small protein/peptide production
PS = *in vitro* phosphorylation
QA = quantitative assay
SP = soluble protein
WB = Western blotting

pETベクターの特性表

pETベクターで利用できるタグなどのクローニングオプションを下表に記載しました.（+）がついているベクターは、f1 originの複製起点を含んでおり、変異導入や塩基配列解析のための1本鎖プラスミドDNAを作成できます。

Vector	amp^R	kan^R	T7	T7*lac*	His•Tag®	T7•Tag$^{[11]}$	T7•Tag$^{[260]}$	S•Tag™	Trx•Tag™	CBD•Tag™	KSI	HSV•Tag®	PKA	Dsb•Tag™	GST•Tag™	Nus•Tag™	protease	signal seq
pET-3a-d	●		●			N												
pET-9a-d		●	●			N												
pET-11a-d	●			●		N												
pET-12a-c	●		●															●
pET-14b	●		●		N												T	
pET-15b	●			●	N												T	
pET-16b	●			●	N												X	
pET-17b	●		●			N												
pET-17xb	●		●				N											
pET-19b	●			●	N												E	
pET-20b(+)	●		●		C													●
pET-21a-d(+)	●			●	C	N												
pET-22b(+)	●			●	C													●
pET-23a-d(+)	●		●		C	N												
pET-24a-d(+)		●		●	C	N												
pET-25b(+)	●			●	C							C						●
pET-26b(+)		●		●	C													●
pET-27b(+)		●		●	C							C						●
pET-28a-c(+)		●		●	N,C	I											T	
pET-29a-c(+)		●		●	C			N									T	
pET-30a-c(+)		●		●	N,C			I									T,E	
pET-30 Ek/LIC		●		●	N,C			I									T,E	
pET-30 Xa/LIC		●		●	N,C			I									T,X	
pET-31b(+)	●			●	C						N							
pET-32a-c(+)	●			●	I,C			I	N								T,E	
pET-32 Ek/LIC	●			●	I,C			I	N								T,E	
pET-32 Xa/LIC	●			●	I,C			I	N								T,X	
pET-33b(+)		●		●	N,C	I							I				T	
pET-34b(+)		●		●	C			I		N							T,E	
pET-35b(+)		●		●	C			I		N							T,X	
pET-36b(+)		●		●	C			I		N							T,E	●
pET-37b(+)		●		●	C			I		N							T,X	●
pET-38b(+)		●		●	C			I		C							T	●
pET-39b(+)		●		●	I,C			I						N			T,E	●
pET-40b(+)		●		●	I,C			I						N			T,E	●
pET-41a-c(+)		●		●	I,C			I							N		T,E	
pET-41 Ek/LIC		●		●	I,C			I							N		T,E	
pET-42a-c(+)		●		●	I,C			I							N		T,X	
pET-43.1a-c(+)	●			●	I,C			I				C				N	T,E	
pET-43.1 Ek/LIC	●			●	I,C			I				C				N	T,E	
pET-44a-c(+)	●			●	N,I,C			I				C				I	T,E	

Vector	amp^R	kan^R	T7	T7*lac*	His•Tag	T7•Tag$^{[11]}$	T7•Tag$^{[260]}$	S•Tag	Trx•Tag	CBD•Tag	KSI	HSV•Tag	PKA	Dsb•Tag	GST•Tag	Nus•Tag	protease	signal seq

Notes: T7 Tag$^{[11]}$ = 11 aa fusion tag T7 Tag$^{[260]}$ = 260 aa fusion tag
signal seq. = signal sequence for potential periplasmic localization
I = internal tag N = N-terminal tag C = optional C-terminal tag
protease cleavage sites: T = thrombin E = enterokinase X = Factor Xa
LIC = ligation-independent cloning

E. pETベクターでのクローニング

発現のためにDNAのタンパク質コード領域をpETベクターへサブクローニングする方法は数多くあります。定方向的なクローニングは、マルチクローニングサイト内の独特な制限酵素サイトや、LIC(Ligation-Independent Cloning)クローニングサイトを利用したりします。LIC法は制限酵素による消化やライゲーションを一切使用せず、LIC用に調製されたインサートをすばやくLICベクターへクローニングできます。全てのpETベクターのマップはwww.novagen.comから取り出すことができます。

すべてのpETベクターは，下流にT7転写ターミネーターをもっているだけでなく，クローニング領域およびタグ領域の後方に，翻訳停止コドンをもっています．ほとんどのタンパク質の効率的な発現にはターミネーターは必要ありませんが，pETプラスミドの多くは目的遺伝子と同じ方向にアンピシリン耐性遺伝子（β-ラクタマーゼ）をもっていることに注意する必要があります．クローニングの際，T7転写ターミネーターが除去されてしまうと，T7 RNAポリメラーゼによる高効率な読み過ごし転写(read-through transcription)のため，通常，目的タンパク質とともにIPTG依存的なβ-ラクタマーゼ（Mr 31.5 kDa）の蓄積が観察されます．

pETベクターには，目的タンパク質と融合すると局在化，検出，精製の機能を発揮する数多くの“タグ”をコードする配列が，クローニング部位の近傍にあります．クローニングの方法により，ベクター由来のこれら“タグ”または付加的なアミノ酸が，目的タンパク質と融合して発現するか否かが決まります．次項では融合の有無に関わらず目的タンパク質を産生するためのクローニングオプションについて説明します．

融合していない野生型タンパク質の産生

ほぼ全てのpETベクターにおいて，ベクター由来の配列を含まないタンパク質を発現させることが可能です．多くのベクターでは，*Nde* Ⅰまたは*Nco* Ⅰ部位が利用できるので，インサート配列の5ュ末端をAUG開始コドンの位置にあわせてクローニングすることができます．同様に，インサートに翻訳停止コドンをもたせることにより，ベクターがコードするC末端の融合配列を含まないようにすることも可能です．

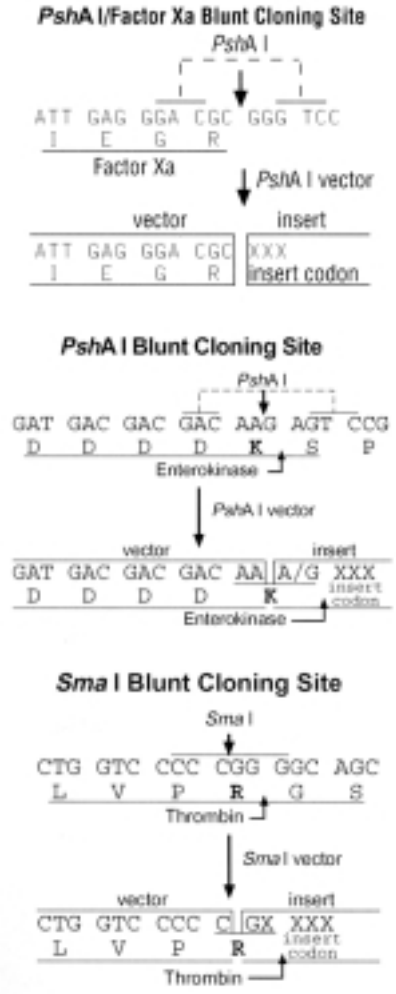
多くのpETベクターにおいて，*Nco* Ⅰ部位（CCATGG）のATGトリプレットは，T7 RNAポリメラーゼ転写産物のN末端メチオニンAUGをコードする開始コドンです．*Nco* Ⅰ部位または対応する突出末端を形成する制限酵素部位［*Bsp*H Ⅰ(TCATGA)，*Bsp*LU11 Ⅰ(ACATGT)，および*Afl* Ⅲ(ACRYGT)と *Sty* Ⅰ(CCWWGG)のサブセット］をORFの開始箇所にもつ目的遺伝子またはPCR増幅インサートは，*Nco* Ⅰ部位にクローニングすることができます．しかしながら，目的遺伝子内に制限酵素部位が複数存在する場合は，これらの制限酵素部位を利用すると混乱を招く結果になりますので注意が必要です．また，これらの制限酵素部位はいずれも，2番目のアミノ酸に対応するトリプレットコドンの最初のヌクレオチドを含むため，目的とするタンパク質の産生が損なわれる可能性があります．このような場合には，これらの部位の“下流”を切断する制限酵素を使用することで，野生型の目的タンパク質の産生を可能にすることができます．下記の表を参照してください．

Enzyme (isoschizomers)	Recognition and cleavage site	Overhangs generated
Bbs I (*Bpi* I,*Bpu*A I)	5′ - GAAGAC(N)$_2$ - 3′ 3′ - CTTCTG(N)$_6$ - 5′	GAAGACNN NNNNN CTTCTGNNNNNN N
Bsa I (*Eco*31 I)	5′ - GGTCTC(N)$_1$ - 3′ 3′ - CCAGAG(N)$_5$ - 5′	GGTCTCN NNNNN CCAGAGNNNNN N
*Bsm*B I (*Esp*3 I)	5′ - CGTCTC(N)$_1$ - 3′ 3′ - GCAGAG(N)$_5$ - 5′	CGTCTCN NNNNN GCAGAGNNNNN N
*Bsp*M I	5′ - ACCTGC(N)$_4$ - 3′ 3′ - TGGACG(N)$_8$ - 5′	ACCTGCNNNN NNNNN TGGACGNNNNNNNN N

Nco Ⅰに対応する突出末端の作製が可能であるのと同様に，上記のいずれの制限酵素部位もPCRプライマー内に組込むことが可能です．制限酵素部位の切断を利用する方法はいずれもそうですが，この適応範囲の広い手法も，目的遺伝子内に制限酵素部位が存在している場合には利用が制限されてしまいます．しかし，インサート内に上記4つの制限酵素部位すべてが存在することはまずあり得ません．

プロテアーゼ処理後の融合タグなし天然タンパク質の生産

GST・Tag[pET-41a-c(+), 42a-c(+)] および Nus・Tag[pET-43.1a-c(+), 44a-c(+)]ベクターは, Factor Xa, エンテロキナーゼ，またはトロンビンの切断部位をコードする配列内に *Psh*A Iまたは *Sma* I認識部位をもっています．左記に示したように，平滑に切断する制限酵素を用いてクローニングを行えば，得られた融合タンパク質をエンテロキナーゼ，Factor Xa，またはトロンビンで切断することにより，ベクター由来のタンパク質配列をすべて取り去ることができます．トロンビンによる切断効率は，切断部位直後のアミノ酸の特性により左右されます．トロンビンによる切断が最適となるのは，インサートにコードされた最初の2～3個のアミノ酸が非極性かつ酸性でない場合です (Chang 1985; Le Bonniec 1991, Le Bonniec 1996) .

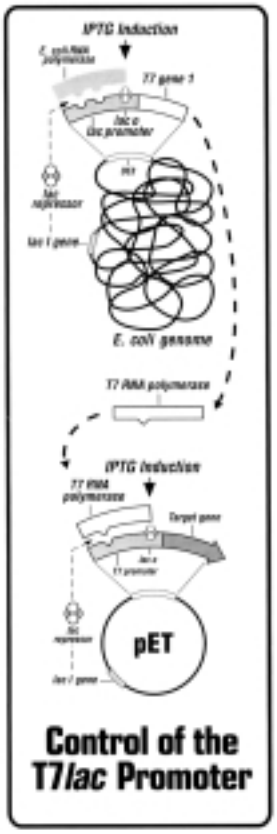


Ligation-independent Cloning

Ligation-independent Cloning（LIC）法は，制限酵素分解やライゲーション反応を行うことなくPCR産物を定方向的にクローニングするために開発された方法です（Aslandis and de Jong, 1990; Haun et al., 1992）．LIC法で作製したpETベクターには，目的インサートの相補的な一本鎖突出末端とアニーリングする12～15塩基の非相補的な一本鎖突出末端が存在します. 目的インサートを増幅するプライマーは，LICベクターに相補的な配列を作製するための5'側の配列を延長する必要があります．T4 DNAポリメラーゼの3'→5'エキソヌクレアーゼ活性により，短いインキュベーションの間に一本鎖突出末端が作製されます．クローニングは定方向的で，ベクターとインサートのアニーリングにより目的産物だけが作られるため，非常に迅速かつ効率的に行われます．pET LICベクターのそのほかの特長として，部位特異的プロテアーゼであるエンテロキナーゼまたはFactor Xaを用いて，ベクターがコードするすべてのアミノ酸を除去することが挙げられます．その他のLICクローニング方法の情報に関しては，テクニカルブリテン163および205を参照してください．

F. pETシステムにおけるタンパク質発現の制御

IPTGの非存在下であっても，λDE3溶原菌の*lacUV5*プロモーターからはT7 RNAポリメラーゼが発現されるので，目的タンパク質が基底レベルで発現されます．大腸菌内にで発現された組換えタンパク質もはすべて，細胞の正常な機能を阻害したり，そのするため大腸菌に対して“毒性”を示す可能性があります．毒性の程度はタンパク質ごとににによって異なりますが，目的タンパク質が大腸菌に対して高い毒性をもつ場合には，基底レベルの発現量でも活発な増殖およびλDE3溶原菌内でのプラスミドの維持が困難になります．しかし，pETシステムでは，目的タンパク質に応じてT7/T7*lac*プロモーター，pLysSまたはpLysE宿主の選択，培地へのグルコースの添加することで，厳密に発現コントロールができるので，タンパク質発現ツールとして威力を発揮します。強力なタンパク質発現ツールなのです．というのも，T7/T7*lac*プロモーター，pLysSまたはpLysE宿主，目的タンパク質の特性に基づく培地へのグルコース添加によって，タンパク質の発現をしっかりとコントロールできるのです．発現系の過剰な抑制はタンパク質発現レベルの低下につながるので注意が必要です．そのためには，下記に示した手段を理解すること，各目的タンパク質に最適な組合わせを実験的に決定することの両方が重要です．



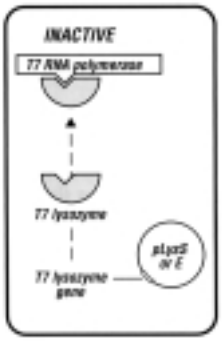
T7*lac*プロモーター

基底発現を制御する1つの方法は，T7*lac*プロモーター配列をもつベクターを使用するものです(Studier et al., 1990; Dubendorff and Studier, 1991; 8ページの表参照)．これらのプラスミドは，T7プロモーターの直後に*lac* オペレーター配列をもっています．また，天然のプロモーターと*lac*リプレッサーのコード配列 (*lacI*)ももつており，T7*lac*プロモーターと*lacI*プロモーターは別々の方向に配されています．この種のベクターをDE3溶原菌において目的遺伝子発現に用いると，*lac*リプレッサーが宿主染色体の*lacUV5*プロモーターに働いて宿主ポリメラーゼによるT7 RNAポリメラーゼ遺伝子の転写を抑制するとともに，ベクターのT7*lac*プロモーターにも働いて，発現されたT7 RNAポリメラーゼによる目的遺伝子の転写も阻害します．これまでのところ，これらのベクターをBL21(DE3)またはHMS174(DE3) で使用した際に，ベクターの安定性が損なわれるほどの毒性を示した目的遺伝子はきわめてわずかです (Dubendorff and Studier, 1991)．pLysSまたはpLysEホストとの組合わせでは，発現が過剰に抑制される場合がありますので，ご注意ください．（12ページの「発現レベルに影響を及ぼすベクターと宿主の組合わせ」参照.）

pLysSおよびpLysE宿主

目的遺伝子の安定性をより高める手段として，天然のT7 RNAポリメラーゼ阻害剤であるT7リゾチームを微量産生する和合性プラスミドをもつ宿主株で目的遺伝子の発現を行うという方法があります(Moffatt and Studier, 1987; Studier, 1991)．T7リゾチームは2つの機能をもったタンパク質で，大腸菌細胞壁のペプチドグリカン層の特定結合を切断する作用 (Inouye et al., 1973) と，T7 RNAポリメラーゼに結合して転写を阻害する作用(Zhang and Studier, 1997; Huang et al., 1999)をもち合わせます．

T7リゾチームとしては，pACYC184の*Bam*H I認識部位に挿入したクローン化T7リゾチーム遺伝子が用いられています (Chang and Cohen, 1978)．クローン化フラグメント (10,665～11,296 bp のT7 DNA ; Dunn and Studier, 1983) は，リゾチーム遺伝子の直後にT7 RNAポリメラーゼのφ3.8プロモーターをもっています．このフラグメントをもつプラスミドのうち，pLysEはリゾチーム遺伝子がpACYC184の*tet*プロモーターから発現するように配されており，このプラスミドをもつ細胞はかなりの量のリゾチームを蓄積します．pLysSは，このフラグメントが逆方向に配されており，このプラスミドをもつ細胞はpLysEよりかなり少量のリゾチームしか蓄積しません．pLysSからのリゾチームの発現は，培養条件によっても異なります．クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）抗生物質耐性遺伝子の上流は代謝物抑制に対して敏感なプロモーターによって制御されているので，グルコースが欠乏した状態でpLysSホスト株を定常期まで培養すると高cAMP濃度となり，CATプロモーター活性を上昇させる原因となることに注意してください．高いCATプロモーター活性は定常期まで培養時に観察されるリゾチームレベル上昇の原因である可能性があります(Novy and Morris, 2001)．クローニングした遺伝子から産生された場合，大腸菌は比較的高濃度のT7リゾチームにも耐性を示します．これは，T7リゾチームが内膜を通過できないためペプチドグリカン層に到達できないからです．



どちらのリゾチームプラスミドも，導入された細胞の形質転換を妨げることはありませんが，pLysSが細胞の増殖速度にほとんど影響を与えないのに対し，pLysEは導入された細胞の増殖速度を著しく低下させます．pLysEによって産生される高濃度のリゾチームにより，細胞増殖までのラグタイムが確かに延び，またT7 RNAポリメラーゼのが誘導依存的であるされることで，目的遺伝子の最大発現量が実質的に低下します．この発現の減弱衰作用により，目的遺伝子産物の毒性が比較的弱い場合には，

導入された細胞はIPTGの存在下で無期限に増殖し続けることが可能となり，これが有用な特性となる場合状況もあります．pLysSまたはpLysEが存在することにより，毒性インサートをもつプラスミドに対するλDE3溶原菌の耐性が増し大，不安定なプラスミドが安定化され，他の方法では構築できないプラスミドの維持および発現が可能となります．pLysEは増殖速度を遅延低減させ，また容易に溶菌しやくなるする傾向があるため，多くの場合には多少利便性に欠けます．従って，非常に毒性が強い遺伝子では，T7*lac*プロモーターをもつベクターとpLysSとの組合わせが適しています．

pLysS（またはpLysE)には，細胞抽出物の調製を容易にするという利点もあります．目的タンパク質の蓄積後，集菌し，50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.0のようなバッファーに懸濁します．この菌体懸濁液を凍結融解するだけ，あるいはそれに0.1% Triton X-100を添加するだけで，内在するT7リゾチームにより効果的な溶菌が起こります．なお，pLysSやpLysEが産出するライソザイムに加え，PopCultureやBugBuster Protein Extraction Reagentを併用するとタンパク質の抽出効率が上昇します．目的プラスミドの安定化が必要ない場合でも，pLysSは有用です．pLysSとpLysEプラスミドは，シグナル配列含むコンストラクトを使用してペリプラズム画分を分離したい際にはお勧めできません．（T7リゾチームを産生するホストでは，細胞膜が壊れてしまうためです．）

発現レベルに影響を及ぼすベクターと宿主の組合わせ

実際に，目的の形態をとるタンパク質の収量をできるだけ高めるには一般的に，ベクターと宿主との組合わせを何通りかテストする価値があります．“通常”のT7プロモーターを使用した場合，pLysSによって産生される微量のリゾチームが，T7 RNAポリメラーゼ誘導後の目的遺伝子発現に影響を及ぼすことはほとんどありません．目的遺伝子産物の出現までに短い遅延がありますが，微量のリゾチームで阻害される以上の量のT7 RNAポリメラーゼが誘導されるのは明らかです．（T7 RNAポリメラーゼは，φ3.8プロモーターからpLysSプラスミドを完全に一周転写して，リゾチームmRNAを産生する力がありますので，誘導時にはリゾチーム量が多少増大することが予想されます．しかし，φ3.8プロモーターは比較的弱く（McAllister et al., 1981），ほとんどの転写は，目的プラスミドで使用されている強力なφ10プロモーターから開始されることになります）． T7*lac*プロモーターを使用した場合，当社では，所定の誘導条件下においてpLysS宿主での発現量がpLysS宿主以外での多少下回ることを観察しています．T7/T7*lac*プロモーター，pLysS宿主およびpLysE宿主を様々な組合わせで用いた場合に見られる2つの目的タンパク質発現の違いを説明する例として，Mierendorf等による1994年の論文を参考にしてください．

グルコース含有培地

Grossman等が初めて明らかにした（1998）ように，pETシステムでは，培地にグルコースを添加することで基底レベルの発現量を低い値に維持することができます．培養が定常期に達するにつれて，まず利用可能なグルコースが消費され，次にグリセロールなどの代わりの炭素源が利用されます．代わりの炭素源の代謝により，サイクリックAMP（cAMP）レベルが上昇し，*lacUV5*からの転写と，引きそれに続くλDE3溶原菌内でのT7 RNAポリメラーゼの発現を促します.野生株の*lac*プロモーターと比べて，*lacUV5*プロモーターはcAMP刺激に対する感度があまり高くありません（Eron and Block, 1971; Fried and Crothers, 1984）．しかし，十分に刺激することでT7 RNAポリメラーゼの値が上昇し，それに伴ってT7プロモーターが制御する目的遺伝子の発現が増加することが示されています（Kelly, 1998; Grossman et al., 1998; Pan and Malcom, 2000; Novy and Morris, 2001）．通常培地にグルコースを添加した培地で定常期まで培養させた場合，*lacUV5*プロモーターからの基底転写量の大幅な減少が観察されています．(Grossman et al., 1998; Pan and Malcom, 2000; Novy and Morris, 2001)

pLysSをもたない宿主を定常期まで増殖させる場合や（16時間，一晩培養など），目的遺伝子に毒性のある場合には，基底レベルの発現量を最小限に抑えることが特に重要です（Grossman et al., 1998; Novy and Morris, 2001）．pLysSプラスミド由来のT7リゾチームがないと，定常期に達した培養液中で基底レベルの発現量が増加します．遺伝子に毒性がある場合，液体培地と寒天プレートいずれにおいても，プラスミドの安定性を維持するために0.5～1%のグルコース添加が必要です．pLysSを含む宿主は，定常期に達するまでにした培養液中で多量のリゾチームを発現するので，誘導される目的タンパク質の量は減少します．これはおそらく，クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子プロモーターがグルコース非存在下でのcAMP刺激に対しても感度が高く，pLysS内のT7リゾチーム遺伝子の上流にあるためと考えられます（Novy and Morris, 2001）．

非発現宿主におけるクローニング操作では，当然ながらグルコースを添加する必要性も利点もありません．培養液を定常期まで増殖させることは推奨しませんが，グルコースは，pETシステムで用いるλDE3溶原菌発現用宿主内の目的タンパク質の基底レベルを低く保ち，T7リゾチームの過剰生産も防ぐ手段となります

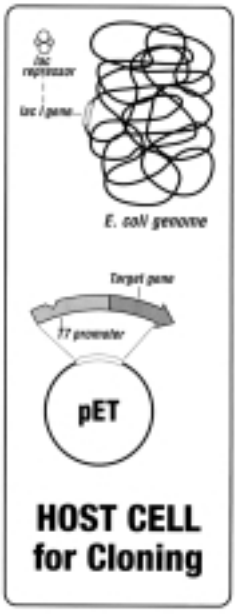
pLacI宿主

(DE3)pLacIをもつ特殊な発現宿主は，pETBlueやpTriExシリーズのベクターとともに使用することを目的としたものです．これらの宿主は，和合性のあるpLacIプラスミドから*lac*リプレッサーを供給することにより非誘導時の発現を厳しく抑制します．pETBlueおよびpTriEx は*lac*リプレッサー遺伝子をもつていないため，これらのプラスミドを発現させる宿主では，宿主由来の*lac*リプレッサーが必要となります．pLacI宿主使用については，pETBlue System Manual (TB249) またはTriEx System Manual (TB250) を参照してください．

pETcocoシステム

λDE3溶原菌内の基底レベルの発現量を最小限に抑えるには，pETcocoベクターを用いる方法もあります．pETベクターでは1細胞あたり20から50のコピーが存在するのに対し，pETcocoベクターでは通常，1細胞あたり1コピーが保持されます．1細胞あたり1コピーが保持されると，組換えや遺伝子再構成の機会が最小限に抑えられ，基底レベルの転写量が減少してpETベクターの約1/40になるので，目的遺伝子が極めて安定になります．pETcoco組換え体を用いたタンパク質の発現は，IPTGにより誘導され，pETベクターの場合と同様の誘導発現量を示します．詳細については，Sektas and Szybalski, 2002やテクニカルブリテン333を参照して下さい．

G. クローニング用宿主

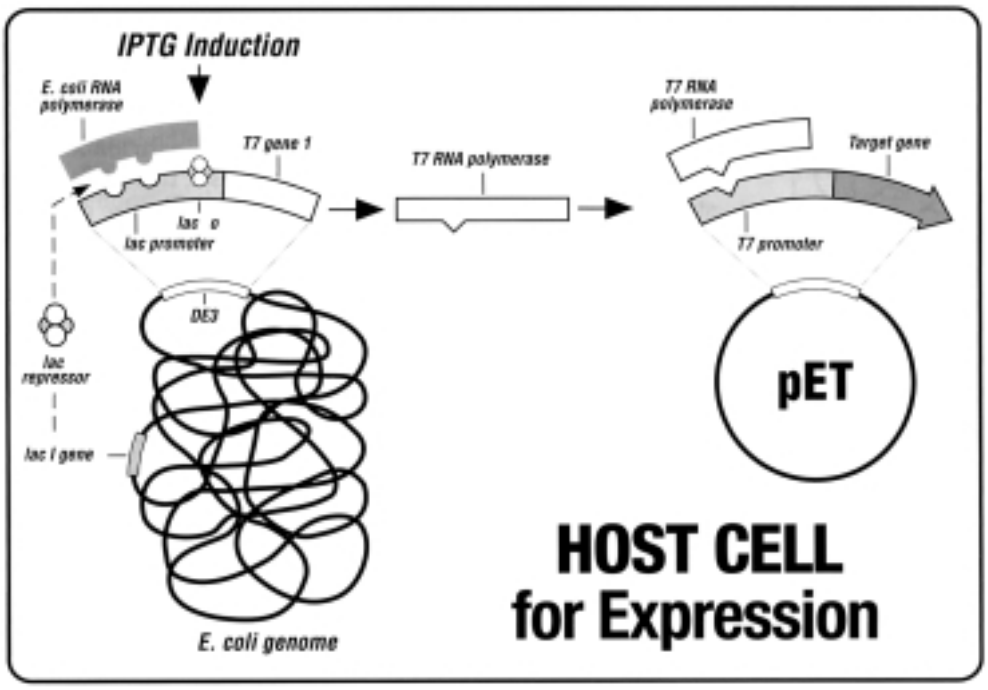


前述したように，pETシステムの優れた特長徴は，きわめて転写活性が低い条件下，つまりT7 RNAポリメラーゼ源の非存在下でも目的遺伝子をクローニングすることができる点にあります．宿主由来のRNAポリメラーゼはT7プロモーターからは転写を開始しないので，pETプラスミドのクローニング部位は宿主由来のRNAポリメラーゼの読み過ごし活性によって（仮に転写されたとしても）僅かにしか転写されない領域にあるため，T7 RNAポリメラーゼ非存在下でもバックグラウンドの発現は最小限です．たとえば目的タンパク質が宿主に対して有害でない場合など，発現宿主に直接クローニングできる場合もありますが，一般的な方法としては勧められません．pETプラスミドではT7プロモーターから転写開始されるので，基底レベルの発現がたとえ少なくても，発現宿主の増殖やプラスミド安定性に問題が生じることもあります．

クローニングに適した大腸菌宿主として，*E. coli* K12株の NovaBlue，JM109， DH5α などがあります．これらの菌株は，recA$^-$ endA$^-$ で形質転換効率が高く，プラスミド収量も多いため，目的DNAをpETベクターで最初にクローニングするのに便利な宿主であり，またプラスミドの維持用にも適しています．NovaBlueにはもう一つの利点があります．NovaBlueは選択F因子をもっているため，ヘルパーファージ感染が可能で，そのため突然変異誘発に用いる一本鎖プラスミドDNAの作製が可能です（これを行えるのはf1複製開始点をもつプラスミドのみです）．pETベクターはlacZα-ペプチドをコードしていないので，pETシステムでは青／白スクリーニングが行えないことに注意してください．T7発現ベクターにおける青／白スクリーニングは，pETBlueプラスミドをNovaBlueと組合わせて使うことで行えます（テクニカルブリテン249参照）．必要であれば，バクテリオファージλCE6を感染させることにより，NovaBlue宿主または他のDE3宿主で発現誘導することも可能です．詳細は18ページの「バクテリオファージCE6」を参照してください．

H. 発現用宿主

タンパク質の産生は，T7 RNAポリメラーゼ遺伝子の染色体コピーをもつ宿主大腸菌株に組換えプラスミドを導入することにより行います（下記に示した例のT7 *gene 1*を参照してください）．これらの宿主は，バクテリオファージDE3の溶原菌です．このバクテリオファージは，ファージ*21*の免疫性領域をもち，*lac I*遺伝子，*lacUV5*プロモーター，T7 RNAポリメラーゼ遺伝子が組込まれたDNAフラグメントをもつλ誘導体です（Studier and Moffat, 1996; Novy and Morris, 2001）．このフラグメントは*int*遺伝子に挿入されており，そのためヘルパーファージの介在なしにDE3が染色体に組込まれることも，染色体から切り出されることもありません．DE3溶原菌が一度形成されると，T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を直接転写することができるプロモーターは，イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）で誘導される*lacUV5*プロモーターだけとなります．増殖している培養溶原菌にIPTGを加えると，T7 RNAポリメラーゼが誘導され，このポリメラーゼによってプラスミド内の目的DNAの転写が行われます．プロテアーゼ欠損，アミノ酸要求性，溶解度可溶性向上，使用頻度の低いコドンの補充などの特性によって，DE3溶原菌株を選択します．また，Novagenでは，λDE3 Lysogenization Kitも提供しており，このキットを用いれば，他の大腸菌株をDE3溶原菌に改変することができます．一般の市販クローニングベクターの中には，T7プロモーターとともに，組換え体の青／白スクリーニング用の*lac*オペレーター／プロモーターをもつものがあります．原理的には，これらのベクターをpET発現宿主と組合わせて使用することもできますが，本目的にはこれらのベクターの使用は適しません．これらのプラスミド上のマルチコピー*lac*オペレーターによって*lac*リプレッサーが奪われるため，同じく*lac*リプレッサーが制御しているpET宿主のT7 RNAポリメラーゼ遺伝子が部分的に誘導されることになります．その結果，基底レベルのT7 RNAポリメラーゼ活性が上昇し，多くの目的遺伝子は安定に保持されなくなります．pETBlueシステムでは，これら各要素のバランスを適切にとっています．



プロテアーゼ欠損株

B834，BL21，BLR，Origami B，Rosetta，Rosetta-gamiB，Tunerなど全てのB株は，*lon*プロテアーゼを欠損しており，精製中にタンパク質分解を引き起こす*ompT*外膜プロテアーゼも欠損しております（Grodberg and Dunn, 1988）．そのため，これらのプロテアーゼをもつ宿主菌株よりもB株で発現させた方が，少なくとも一部の目的タンパク質の安定性は増します．BL21（DE3）は，目的遺伝子の発現用として最も広く使用されている宿主です．BLR（DE3）はウィスコンシン大学A. Roca氏が作製したBL21のrecA誘導株で，繰り返し配列をもつ目的遺伝子の安定性が増すこともあります．Origami B，Rosetta，Rosetta-gamiBおよびTuner株については次項に詳しく記載しました．

培養液中における全細胞の発現量調整

Tuner株および誘導株（Origami BとRosetta, Rosetta-gamiB）はBL21の*lacY1*欠損変異体で，培養液中において全細胞の発現量を調整できます．*lac*パーミアーゼ（*lacY1*）の突然変異によって，IPTGが全細胞に均一に浸透移行することが可能となり，それによって濃度依存的なの均一質なレベルで誘導が誘導が行われます．IPTG濃度を調整することで，非常に低いレベルから，pETベクターで十二分に強く誘導したレベルまで，発現量を制御することができます．低いレベルでの発現により，扱いにくい目的タンパク質の溶解性可溶性および活性が上昇することがあります．

ジスルフィド結合の形成および可溶溶解性の向上

多くのタンパク質が，本来のコンフォメーションに正しくフォールドされるには，安定なジスルフィド結合を形成する必要があります．ジスルフィド結合が形成されないと，これらのタンパク質は分解するか，もしくは封入体として蓄積してしまいます．大腸菌9細胞内は比較的高い還元状態にあり，正しくフォールドされたタンパク質をの産生は限られているのでするには限界がありました．正しくフォールディングするために必要なジスルフィド結合は，通常，ペリプラズムへの移行によってのみ形成されます．グルタチオンリダクターゼ（*gor*）変異とチオレドキシンリダクターゼ（*trxB*）変異（AD494，BL21trxB，Origami，Origami B，Rosetta-gami）の両方または一方を含む大腸菌株では，大腸菌細胞質内のジスルフィド結合形成が促進されます（Prinz et al., 1997; Aslund et al., 1999）．AD494（DE3）およびBL21*trxB*（DE3）は*trxB*変異のみをもちつ一方で，Origami（DE3），Origami B（DE3），Rosetta-gami（DE3）は*gor*変異およびtrxB変異の両方をもっています．*trxB*／*gor*変異株はジスルフィド結合の形成を促進し，最終的に，*trxB*変異のみの場合よりも高い程度まで可溶溶解性および活性を上昇させます（Bessette et al., 1999）．全体的な発現量は同程度様でも，Origami（DE3）では他の宿主の場合よりも10倍以上の活性タンパク質を発現することが示されています（Prinz et al., 1997）．*trxB*変異はカナマイシン選択により維持されることにご注意ください．このため，これらの菌株はカナマイシン耐性pETプラスミドにクローニングされた目的遺伝子の発現には適していません．また，Origami およびRosetta-gamiはK-12株ですが，Origami BはB株ですので*ompT*および*lon*プロテアーゼを欠損しており，*lacY1*に変異をもっていることに注意する必要があります．

使用頻度の低いコドンの補充

ほとんどのアミノ酸は2つ以上のコドンでコードされていて，各生物には，61個のアミノ酸コドンを利用する上で，独自の傾向があります．各細胞において，tRNAポピュレーションはmRNAポピュレーションのコドン傾向を厳密に反映しています．異生物種由来の目的遺伝子のmRNAが大腸菌内に発現すると，ポピュレーションの中で使用頻度が低いまたは欠損している1つ以上のtRNAが必要になるため，コドン使用頻度の相違により翻訳が妨げられることがあります．tRNAプールが十分でない場合，翻訳速度の失速，途中での翻訳停止，翻訳フレームのずれ，間違ったアミノ酸の取り込みの原因となります．Rosetta株は，大腸菌内でほとんど使用されないコドンをもつ真核生物タンパク質の発現を促進するように設計されています（Brinkmann et al., 1989; Seidel et al., 1992; Kane, 1995; Kurland and Gallant, 1996）．宿主内において使用頻度の低いtRNAの量を増やすことで，異生物種由来のこのようなタンパク質の発現量を劇的に増やせます（Brinkmann et al., 1989; Seidel et al., 1992; Roseneberg et al., 1993; Del Tito et al., 1995）．Rosetta株は，適合性のあるクロラムフェニコール耐性プラスミド上に組込まれたAUA，AGG，AGA，CUA，CCC，GGAコドンに対応するtRNAを供給します．この株は，大腸菌のコドン使用頻度差により制限されている目的遺伝子の発現を促進します（Novy et al., 2001）．それぞれのtRNA遺伝子は，野生型のプロモーターから誘導されます．pLysS Rosetta株，pLacI Rosetta株では， 各々T7溶原菌遺伝子，*lac*リプレッサー遺伝子が載った同じプラスミド上に，使用頻度の低いtRNA遺伝子群が存在します．Rosetta系は，BL21 *lacY1*変異Tuner株由来です．RosettaBlue株，Rosetta-gami株は，各々NovaBlue株，Origami株由来で，元株の特長をそなえています．

セレノメチオニン標識

B834株は，メチオニン要求株でBL21株の親株です．B834株は，結晶学向けの高比活性の^{35}S-メチオニン標識用およびセレノメチオニン標識用としても適しています（Wood, 1966; Leahy et al., 1992）．いくつかの目的タンパク質では，BL21（DE3）より B834（DE3）を用いた方が有意に高い産生量が得られますが，このことは親菌株を使用する利点が他にもある可能性を示唆しています（Doherty, 1995）．

pETシステム宿主株の特性

この表には，pETシステムにおいてクローニングや発現用に一般的に用いられる菌株の遺伝子型を記載しました．Novagenでは，グリセロールストックおよび形質転換用のコンピテントセル細胞の形でご用意しております．グリセロールストックおよびコンピテントセル細胞の宿主株のカタログ番号は，65から68ページに記載してあります．

Strain	Deriv.	Genotype	Description/Application	Antibiotic Resistance[5]
AD494	K-12	*Δara–leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR ΔmalF3* F'[*lac*$^+$(*lacI*^{q})*pro*] *trxB*::kan	*trxB*$^-$ non-expression[2] host; allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm	Kanamycin (15 µg/ml)
AD494(DE3)	K-12	*Δara–leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR ΔmalF3* F'[*lac*$^+$(*lacI*^{q})*pro*] *trxB*::kan(DE3)	*trxB*$^-$ expression[3] host; allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm	Kanamycin (15 µg/ml)
AD494(DE3)pLysS	K-12	*Δara*$^-$ *leu7967 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR ΔmalF3* F'[*lac*$^+$(*lacI*^{q})*pro*] *trxB*::kan(DE3) pLysS	*trxB*$^-$ high-stringency[3,4] expression host; allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm	Kanamycin (15 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
B834	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm met*	*met* auxotroph, parent of BL21, control non-expression[2] host	none
B834(DE3)	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm met* (DE3)	met auxotroph parent of BL21, general expression[3] host, ^{35}S-met labeling	none
B834(DE3)pLysS	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm met* (DE3) pLysS	met auxotroph, parent of BL21, high-stringency expression[3,4] host, ^{35}S-met labeling	Chloramphenicol (34 µg/ml)
BL21	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm*	control non-expression[2] host	none
BL21(DE3)	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)	general purpose expression[3] host	none
BL21(DE3)pLysS	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cm^R)	high-stringency[3,4] expression host	Chloramphenicol (34 µg/ml)
BL21*trxB*(DE3)	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm trxB*15::kan (DE3)	general expression[3] host; allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm	Kanamycin (15 µg/ml)
BL21*trxB*(DE3)pLysS	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm trxB*15::kan (DE3) pLysS (Cm^R)	high-stringency[3,4] expression host; allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm	Kanamycin (15 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
BLR	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$* (r_B^- m_B^-) *gal dcm Δ*(*srl–recA*)*306*::Tn*10* (Tc^R)	*recA*$^-$ non-expression[2] host recommended for use with tandem repeats	Tetracycline (12.5 µg/ml)
BLR(DE3)	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$* (r_B^- m_B^-) *gal dcm Δ*(*srl–recA*)*306*::Tn*10* (Tc^R) (DE3)	*recA*$^-$ expression[3] host recommended for use with tandem repeats	Tetracycline (12.5 µg/ml)
BLR(DE3)pLysS	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$* (r_B^- m_B^-) *gal dcm Δ*(*srl–recA*)*306*::Tn*10* (DE3) pLysS	*recA*$^-$ high-stringency[3,4] expression host recommended for use with tandem repeats	Chloramphenicol (34 µg/ml) Tetracycline (12.5 µg/ml)
HMS174	K-12	F$^-$ *recA hsdR*(r_{K12}^- m_{K12}^+) *Rif*^{R}	control non-expression[2] host	Rifampicin (200 µg/ml)
HMS174(DE3)	K-12	F$^-$ *recA hsdR*(r_{K12}^- m_{K12}^+) *Rif*^{R} (DE3)	*recA*$^-$ K-12 expression[3] host	Rifampicin(200 µg/ml)
HMS174(DE3)pLysS	K-12	F$^-$ *recA hsdR*(r_{K12}^- m_{K12}^+) *Rif*^{R} (DE3) pLysS	*recA*$^-$ K-12 high-stringency[3,4] expression host	Chloramphenicol (34 µg/ml) Rifampicin (200 µg/ml)
NovaBlue	K-12	*endA1 hsdR17*(r_{K12}^- m_{K12}^+) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* F'[*proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q}*ZΔM15* ::Tn*10*(Tc^R)]	non-expression[2] host, general purpose cloning, plasmid preps	Tetracycline (12.5 µg/ml)
NovaBlue(DE3)	K-12	*endA1 hsdR17*(r_{K12}^- m_{K12}^+) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* F'[*proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q}*ZΔM15* ::Tn*10*(Tc^R)] (DE3)	*recA*$^-$ *endA*$^-$ K-12 *lacI*^{q} expression[3] host recommended for use with NovaTope-® System	Tetracycline (12.5 µg/ml)
Origami™ B	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm lacY1 ahpC gor522*::Tn*10* (Tc^R) *trxB*::kan	control non-expression[2] host	Tetracycline (12.5 µg/ml) Kanamycin (15 µg/ml)
Origami B(DE3)	B	F$^-$ *ompT hsdS$_B$*(r_B^- m_B^-) *gal dcm lacY1 ahpC gor522*::Tn*10* (Tc^R) *trxB*::kan (DE3)	general expression[3] host; contains Tuner *lac* permease mutation and *trxB/gor* mutations for cytoplasmic disulfide bond formation	Tetracycline (12.5 µg/ml) Kanamycin (15 µg/ml)

Strain	Deriv.	Genotype	Description/Application	Antibiotic Resistance[1]
Origami B(DE3) pLysS	B	*F⁻ ompT hsdS$_B$(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1 ahpC gor522*::Tn*10* (Tc^R) *trxB*::kan (DE3) pLysS (Cm^R)	high-stringency[3,4] expression host; general expression host; contains Tuner *lac* permease mutation and *trxB/gor* mutations for cytoplasmic disulfide bond formation	Tetracycline (12.5 µg/ml) Kanamycin (15 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
Origami™ [5]	K-12	*Δara–leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'[*lac*$^+$(*lacI*^{q})*pro*] *gor522* ::Tn*10* (Tc^R) *trxB*::kan	control non-expression[2] host	Tetracycline (12.5 µg/ml) Kanamycin (15 µg/ml)
Origami(DE3)[5]	K-12	*Δara–leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'[*lac*$^+$(*lacI*^{q})*pro*] *gor522* ::Tn*10* (Tc^R) *trxB*::kan (DE3)	general expression[3] host; two mutations in cytoplasmic disulfide reduction pathway enhance disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm	Tetracycline (12.5 µg/ml) Kanamycin (15 µg/ml)
Origami(DE3)pLysS[5]	K-12	*Δara–leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'[*lac*$^+$(*lacI*^{q})*pro*] *gor522* ::Tn*10* (Tc^R) *trxB*::kan (DE3) pLysS (Cm^R)	high-stringency[3,4] expression host; two mutations in cytoplasmic disulfide reduction pathway enhance disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm	Tetracycline (12.5 µg/ml) Kanamycin (15 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
Rosetta™	B	*F⁻ ompT hsdS$_B$(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1* pRARE[6] (Cm^R)	control non-expression[2] host	Chloramphenicol (34 µg/ml)
Rosetta(DE3)	B	*F⁻ ompT hsdS$_B$(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1* (DE3) pRARE[6] (Cm^R)	general expression[3] host; *lac* permease mutation allows control of expression level, provides rare codon tRNAs	Chloramphenicol (34 µg/ml)
Rosetta(DE3)pLysS	B	*F⁻ ompT hsdS$_B$(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1* (DE3) pLysSRARE[6] (Cm^R)	high-stringency[3,4] expression host; *lac* permease mutation allows control of expression level, provides rare codon tRNAs	Chloramphenicol (34 µg/ml)
RosettaBlue™	K-12	*endA1 hsdR17(r_{K12}^- m_{K12}^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* F'[*proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q}*ZΔM15* ::Tn*10*(Tc^R)] pRARE[6] (Cm^R)	control non-expression[2] host	Tetracycline (12.5 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
RosettaBlue(DE3)	K-12	*endA1 hsdR17(r_{K12}^- m_{K12}^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* F'[*proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q}*ZΔM15* ::Tn*10*(Tc^R)] (DE3) pRARE[6] (Cm^R)	*recA*$^-$ *endA*$^-$ K-12 *lacI*^{q} general expression[3] host; provides rare codon tRNAs	Tetracycline (12.5 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
RosettaBlue™DE3) pLysS	K-12	*endA1 hsdR17(r_{K12}^- m_{K12}^+) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* F'[*proA*$^+$*B*$^+$ *lacI*^{q}*ZΔM15* ::Tn*10*(Tc^R)] (DE3) pLysSRARE[6] (Cm^R)	*recA*$^-$ *endA*$^-$ K-12 *lacI*^{q} high-stringency[3,4] expression host; provides rare codon tRNAs	Tetracycline (12.5 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
Rosetta-gami™ [5]	K-12	*Δara–leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'[*lac*$^+$(*lacI*^{q})*pro*] *gor522* ::Tn*10* (Tc^R) *trxB*::kan pRARE[6] (Cm^R)	control non-expression[2] host	Tetracycline (12.5 µg/ml) Kanamycin (15 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
Rosetta-gami(DE3)[5]	K-12	*Δara–leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'[*lac*$^+$(*lacI*^{q})*pro*] *gor522* ::Tn*10* (Tc^R) *trxB*::kan (DE3) pRARE[6] (Cm^R)	general expression[3] host; two mutations in cytoplasmic disulfide reduction pathway enhance disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm, provides rare codon tRNAs	Tetracycline (12.5 µg/ml) Kanamycin (15 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
Rosetta-gami (DE3)pLysS[5]	K-12	*Δara–leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'[*lac*$^+$(*lacI*^{q})*pro*] *gor522* ::Tn*10* (Tc^R) *trxB*::kan (DE3) pLysSRARE[6] (Cm^R)	high-stringency[3,4] expression host; two mutations in cytoplasmic disulfide reduction pathway enhance disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm, provides rare codon tRNAs	Tetracycline (12.5 µg/ml) Kanamycin (15 µg/ml) Chloramphenicol (34 µg/ml)
Tuner™	B	*F⁻ ompT hsdS$_B$(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1*	control non-expression[2] host	none
Tuner(DE3)	B	*F⁻ ompT hsdS$_B$(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1* (DE3)	general expression[3] host; *lac* permease mutation allows control of expression level	none
Tuner(DE3)pLysS	B	*F⁻ ompT hsdS$_B$(r_B^- m_B^-) gal dcm lacY1* (DE3) pLysS (Cm^R)	high-stringency[3,4] expression host: *lac* permease mutation allows control of expression level	Chloramphenicol (34 µg/ml)

1. The appropriate drug to select for the target plasmid must also be added.
2. In this context, non-expression means that the strain does not contain the gene for T7 RNA polymerase and therefore will not express from target genes under the control of a T7 promoter. These strains may be suited for expression from *E. coli* promoters such as *lac*, *tac*, *trc* and *trp*, or for infection by λCE6 for pET expression.
3. Expression means that the strain is a λDE3 lysogen, i.e., it carries the gene for T7 RNA polymerase under *lacUV5* control. It is therefore suited to expression from T7 promoters.
4. High-stringency means that the strain carries pLysS, a pET-compatible plasmid that produces T7 lysozyme, thereby reducing basal expression of target genes. pLysE hosts provide even greater stringency; these are available separately as glycerol stocks.
5. The original *trxB/gor* double mutant (Stewart, 1968) required reducing agent in the growth medium to support normal growth rates. The Origami™ strains are a derivative (FA113) of the original strain that carry a mutation (*ahpC*) which allows normal growth rates in the absence of supplemental reducing agent (Bessette et al., 1999; Ritz et al., 2001).
6. pRARE and pLysSRARE encode the tRNA genes *argU*, *aruW*, *ileX*, *glyT*, *leuW*, *proL*, *metT*, *thrT*, *tgrU* and *thrU*. The rare codons AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, and GGA are supplemented (Novy et al., 2001).

I. 抗生物質耐性

pETベクターではamp（アンピシリン耐性，Apとも，β-ラクタマーゼ遺伝子を表す*bla*とも略される）または，kan（カナマイシン耐性）選択マーカーを利用できます．選択マーカーについては8ページの表に記載されています．どちらの選択方法も広く用いられていますが，β-ラクタマーゼ遺伝子をもつベクターを使用する場合には，簡単なプロトコールをいくつか利用できます．V項の「発現の最適化」を参照してください．アンピシリン耐性は，さまざまなクローニングベクターとして一般的に用いられていますが，たとえばタンパク質の発現をGMP標準の実験室で行わなければならない場合や，他のアンピシリン耐性ベクターから目的遺伝子をサブクローニングする場合のような特定の状況下では，カナマイシン耐性の方が望ましいと思われます．アンピシリンは，分泌されたβ-ラクタマーゼや，大腸菌発酵でよく起こるpHの低下によって分解されてしまうため，培養中にその効果が失われがちです．薬剤耐性の消失を避けるには，新しいアンピシリン含有培地に交換したり，低pHに低感受性のカルベニシリンを使用したりするなどの方法があります．

kan^R pETベクターと多くのamp^R pETベクターとのもう一つの相違点は，薬剤耐性遺伝子の転写の方向が異なることです．kan^R pETベクターでは，*kan*遺伝子はT7プロモーターに対して逆側にあるので，T7プロモーターが誘導されても*kan*遺伝子産物が増加することはありません．これに対して，ほとんどのamp^R pETベクターでは，β-ラクタマーゼ遺伝子がT7プロモーターの下流の同じ側にあります．すべてのpET翻訳ベクターは，β-ラクタマーゼ遺伝子の前に内在性のT7転写ターミネーター（Tφ）をもっています．しかし，このターミネーターの効力は約70%しかないため，T7 RNAポリメラーゼによる読み過ごしが生じて，目的のRNA以外にもわずかながらβ-ラクタマーゼ RNAが産生されてしまいます．そのため，発現誘導した培養液にβ-ラクタマーゼが蓄積してしまいます．この問題に対処するため，pET-43.1 ベクターおよびpET-44ベクターではβ-ラクタマーゼ遺伝子の方向を逆転させ，T7 RNAポリメラーゼによる読み過ごしによってβ-ラクタマーゼ遺伝子産物の発現量が増加することを避けています．

J. バクテリオファージ CE6

毒性遺伝子発現に対する対策として，バクテリオファージCE6を感染させてT7 RNAポリメラーゼを導入するという方法があります．CE6は，ファージp_Lおよびp_Iプロモーターで駆動されるクローン化ポリメラーゼ遺伝子，*cI857*熱感受性リプレッサー，*Sam7*溶解変異をもつλ組換え体です（Studier and Moffatt, 1986）．CE6が適当な宿主に感染すると，新たに産生されたT7 RNAポリメラーゼが目的DNAを活発に転写するため，正常なファージの増殖は行われません．利便性の面ではDE3溶原菌を用いた誘導発現に劣りますが，この方法は，他のどのような方法でも維持できないような毒性のきわめて高い目的遺伝子産物の発現に使用することができます．感染前の菌体内にはT7 RNAポリメラーゼが存在しないため，この方法を使えば，T7プロモーターで制御してクローニングできるあらゆる目的DNAの発現が可能なはずです．CE6はNovagenにて別途提供しております．テクニカルブリテン007を参照してください．

K. 誘導コントロール株

各pETベクターおよび発現システムには，プロモーター，選択マーカー，その他のベクターエレメントのタイプに適合した誘導コントロール株が含まれているので，性能検査が容易です．誘導コントロール株は，クローニングには適しておりません．誘導コントロール株は，β-ガラクトシダーゼをコードしたインサートが組込まれたpETプラスミドをもつ適切なλDE3溶原菌のグリセロールストックとしてご用意しております（Controls H，J，L，N，O.1は例外で，これらはインサートをもっていません）．β-ガラクトシダーゼは，分光光度計により容易にアッセイできます．下表に，さまざまな誘導コントロール株と，対応するpETベクターの一覧を掲載しました．β-ガラクトシダーゼアッセイの詳細については，57ページの「誘導コントロール」を参照してください．

Control	Vector	Host strain	Selection	Promoter	Fusion tags	Protease site	Insert (protein size)	Included with vector/series	Cat. No.
A	pET-14b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7	His•Tag®	T	β-gal 118kDa	pET-3, 5, 12, 14b, 17b, 17xb, 20b, 23	69674
B	pET-15b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7*lac*	His•Tag	T	β-gal 118kDa	pET-11, 15b, 21, 22b, 25b	69257
C	pET-16b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7*lac*	His•Tag	X	β-gal 119kDa	pET-16b	69675
D	pET-19b	BL21(DE3)pLysS	amp cam	T7*lac*	His•Tag	E	β-gal 119kDa	pET-19b	69676
E	pET-28b(+)	BL21(DE3)	kan	T7*lac*	His•Tag T7•Tag®	T	β-gal 119kDa	pET-0, 24, 26b, 27b, 28	69258
F	pET-29b(+)	BL21(DE3)	kan	T7*lac*	S•Tag™	T	β-gal 119kDa	pET-29	69259
G	pET-30b(+)	BL21(DE3)	kan	T7*lac*	His•Tag S•Tag	T, E	β-gal 121kDa	pET-30	69654
H	pET-31b(+)	BLR(DE3)pLysS	amp cam, tet	T7*lac*	KSI		none 14.8kDa	pET-31b	69966
J	pET-32a(+)	BL21(DE3)	amp	T7*lac*	Trx•Tag™ His•Tag S•Tag	T, E	none 20.4kDa	pET-32	69030
K	pET-34b(+)	BL21(DE3)	kan	T7*lac*	CBD_{cbm}•Tag S•Tag	T, E	β-gal 138kDa	pET-34b, 35b, 36b, 37b, 38b	70125
L	pET-39b(+)	BL21(DE3)	kan	T7*lac*	DsbA•Tag™ His•Tag S•Tag	T, E	none 32.2kDa	pET-39b, 40b	70463
M	pET-33b(+)	BL21(DE3)	kan	T7*lac*	His•Tag PKA site T7•Tag	T	β-gal 120kDa	pET-33b	70514
N	pET-41b(+)	BL21(DE3)	kan	T7*lac*	GST•Tag™ His•Tag S•Tag	T, E	none 35.6kDa	pET-41, 42	70535
O.1*	pET-43.1b(+)	BL21(DE3)	amp	T7*lac*	Nus•Tag™ His•Tag S•Tag HSV•Tag®	T, E	none 66.4kDa	pET-43.1, 44	70965

Abbreviations: amp = ampicillin or carbenicillin, kan = kanamycin, cam = chloramphenicol, tet = tetracycline

T = thrombin, X = Factor Xa, E = enterokinase

* Induction control O (70833-3) has identical characteristics as O.1 with the exception that pET-43b(+) was provided.

II. 始めるにあたって

A. pETシステムの手順

Process	Detail
Prepare pET Vector	1. Digest with restriction enzyme(s) and dephosphorylate, or use LIC vector 2. Gel purify (or use LIC vector)
Prepare Insert DNA	1. Plasmid prep and/or PCR 2. Restriction digest or generate LIC overhang 3. Gel purify
Clone Insert into pET Vector	1. Ligate or anneal insert with pET vector 2. Transform into non-expression host (e.g. NovaBlue) 3. Identify positive clones; colony PCR, prepare plasmid DNA, verify reading frame by sequencing, or *in vitro* transcription/translation
Transform into Expression Host	1. Transform host carrying T7 RNA polymerase gene (λDE3 lysogen) or non-DE3 host compatible with CE6 infection
Induce and Optimize Expression of Target Protein	1. Optional: test the plasmid stability 2. Determine time course and temperature for expression in total cell and subcellular fractions; analyze solubility and activity 3. Detect target protein by SDS-PAGE, Western blot, quantitative assay
Scale-up	1. Scale up culture 2. Prepare extract
Purify Target Protein	3. Affinity purify 4. Cleave tags and remove protease (if desired)

B. 増殖培地

菌株の増殖やpET Systemによる目的DNAの発現に適した培地として，さまざまな増殖培地を利用することができます．最適な増殖培地はM9，M9ZB，LB，およびTB（“terrific broth”）です．組成およびストック溶液については，下記を参照してください．

LB*	**M9**	**M9ZB** (Studier et al., 1990)
Per liter: 10 g Bacto tryptone 5 g Yeast extract 10 g NaCl Adjust pH to 7.5 with 1N NaOH Autoclave	Per liter: 50 ml 20X M9 salts 20 ml 20% glucose 1 ml 1 M $MgSO_4$ 0.5 g NaCl 930 ml autoclaved deionized H_2O	Per liter: 10 g N-Z-amine A (Quest) 5 g NaCl Autoclave and cool Add 100 ml 10X M9 salts, 1 ml 1M $MgSO_4$, 10 ml 40% glucose (from autoclaved stocks)

10X M9 salts	**20X M9 salts**	**K phosphate**
Per liter: 10 g NH_4Cl 30 g KH_2PO_4 60 g Na_2HPO_4 $7H_2O$ Autoclave	Per liter: 20 g NH_4Cl 60 g KH_2PO_4 120 g Na_2HPO_4 $7H_2O$ Autoclave	Per liter: 23.1 g KH_2PO_4 125.4 g K_2HPO_4 Autoclave

TB* (Sambrook et al., 1989)
Per liter: 900 ml deionized water 12 g Bacto tryptone 24 g Yeast extract 4 ml glycerol Autoclave, cool to 60°C Add 100 ml sterile K phosphate

Stock solution	Preparation	Cat. No.
100 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)	2.38 g IPTG in 100 ml deionized water. Filter sterilize and store at –20°C.	70527-3*
Carbenicillin (disodium salt)	50 mg/ml in deionized water. Store at –20°C. Use at 50 µg/ml.	69101-3
Ampicillin (sodium salt)	25 mg/ml in deionized water. Store at –20°C. Use at 50 µg/ml.	171254 (Calbiochem)
Chloramphenicol	34 mg/ml in ethanol. Store at –20°C. Use at 34 µg/ml.	220551 (Calbiochem)
Kanamycin (sulfate)	30 mg/ml in deionized water. Store at –20°C. Use at 30 µg/ml for cells containing kan^R plasmids, and at 15 µg/ml for cells with a chromosomal kan^R gene (AD494, BL21*trxB*, Origami™, Origami B, Rosetta-gami™).	420311 (Calbiochem)
Tetracycline	12.5 mg/ml in ethanol. Store at –20°C. Use at 12.5 µg/ml.	58346 (Calbiochem)
Rifampicin	10 mg/ml in 67% methanol, 0.17 N NaOH. Use at 200 µg/ml within 5 days. Protect from light.	557303 (Calbiochem)
Glucose	20% (w/vol) D-glucose solution in H_2O. Autoclave. Store sterile solution at room temperature. Add glucose to LB agar with antibiotics to a final concentration of 0.5–1% (see page 12).	346352 (Callbiochem)

*100 mM IPTG Solution

C.菌株の保存

宿主およびpET 組換え体の長期保存には，グリセロールストックが最適です．グリセロール濃度が高いと (> 10%) ，プラスミドの不安定化を引き起こすことがありますので注意が必要です．

宿主株および pET組換え体の保存用培養液の調製:

1. 単一のコロニーを，適切な抗生物質を含む培地50 mlを入れた250 mlフラスコに植菌する．
2. OD_{600}が0.6～0.8に達するまで，37 ° Cで激しく振とう培養する．
3. 0.9 mlをクライオバイアルに移し，0.1倍量の80%グリセロールを添加する．
4. よく混合し，-70 ° Cで保存する．

プラスミドをもつ菌株，なかでも不安定化しやすい菌株については，凍結時にタイターを測定し，培養中の大部分の細胞が目的とするプラスミドをもつていることを確認します． 34ページの「発現の最適化」を参照してください．

凍結ストックから培地への植菌:

1. 表面から数µlをかき取るか融解する (滅菌ピペットチップまたはプラスチック製の培養用ループを使用する) .
2. (抗生物質を含む)寒天プレート上に画線塗抹する．あるいは液体培地に植菌する．
3. 残りは融解させずにそのまま-70 ° Cフリーザーに戻す．

D. ベクターの調製

ベクター調製の際は，お客様がご使用の制限酵素のメーカーが推奨するバッファーとインキュベーションの条件を用いてください．同じバッファー中で一緒に使用できる酵素の組合わせは多数あります．

酵素が異なれば切断効率も異なることにご注意ください．特に2つの切断部位が近接している場合にはこの傾向が強まります．一般に，使用するバッファーに適合性があり，各々の切断部位が10 bp以上離れていれば，それらの酵素を1回の反応で同時に使用することが可能です．一方の酵素の切断効率が低い場合や，バッファーに適合性がない場合，または切断部位の距離が10 bp以下である場合は，別々に消化を行う必要があります．まず，もっとも切断効率の低い酵素で消化し，反応液の一部をアガロースゲル電気泳動して消化を確認した後，2番目の酵素を添加してください．

一部の制限酵素は，塩基配列依存性があまり強くないために特異性が変化する“ スター活性 ”を示す場合があることにご注意ください．スター活性を引き起こす条件には，高グリセロール濃度 (> 5%)，高pH，低イオン強度などがあります．

注: I項の「本システムについて」で述べた通り，NovagenのEk/LICおよびXa/LIC Vector Kitsを使ってLIC 法を実施することにより，制限酵素消化を行うことなくPCR産物や他のフラグメントをクローニン グすることもできます．この場合，LIC Vector Kitsに添付のプロトコールに従ってください．

単一部位にクローニングする場合は，ベクターのセルフライゲーションに起因する非組換え体バックグラウンドを低減するため，消化後にベクターを脱リン酸化します．分子生物学グレードの仔ウシ小腸（カルビオケムカタログ番号524576）またはエビ由来のアルカリホスファターゼを，メーカーの取扱説明書に従って使用してください．

2種類の酵素で切断する場合にも，ベクターの脱リン酸化は効果的です．2つの切断部位が近接していたり一方の酵素の切断効率が低い場合には，特に有効です．この処理を行えば，一方の酵素の不完全な消化により生じる，ゲル分析では検出不能な非組換え体バックグラウンドを低減することができます．

消化後，インサートをライゲーションする前にゲル精製を行い，残存するニックの入ったプラスミドやスーパーコイル状のプラスミド(目的のライゲーション産物よりもはるかに効率的にトランスフォームされる)を除去することが通常有効です．このステップは任意ですが，通常，正しく構築されたベクターのスクリーニングするのに労力を軽減することができます．NovagenのSpinPrep Gel DNA Kit は，アガロースゲルスライスからのDNAフラグメントを迅速に分離するのに最適です．

ベクターの消化・ゲル精製:

1. 微量遠心チューブに下記の組成の反応液を調製する．

3 µg	pET vector
3 µl	10X 制限酵素バッファー
10-20U	各制限酵素のユニット（グリセロール濃度が高くならない様にバッファーに互換性があり，酵素総量が反応液量の10%を超えないものと仮定して）
3 µl	1mg/mlアセチル化BSA（オプショナル）
X µl	ヌクレアーゼフリー水で液量を合わせる
30 µl	トータルボリューム

2. 適温 (通常37 ° C)で2～4時間インキュベートする．
3. このサンプル3 µlを，Perfect DNA Markersとともにアガロースゲルで電気泳動し，消化の程度を確認する．
4. 消化が完全に行われていたら，残りの消化液に仔ウシ小腸由来アルカリホスファターゼを加える．この酵素は，ここに示す条件下において，ほとんどの制限酵素用バッファー中で活性を示す．適正な量の酵素を使用することが重要である．量が多すぎると不都合な欠失を招き，また以降のステップのために酵素を除去するのが困難となる．一般的なpETベクター (5 kbp) の3 µg は，直鎖状化した場合の約2 pmolのDNA末端に相当し，2種類の酵素で消化した場合の約4 pmolの末端に相当する．当社では，末端1 pmol当たり0.05 unitのアルカリホスファターゼを使用することをお勧めしている．必要であればこの酵素を，使用直前に水または50 mM Tris-HCl, pH9.0で希釈する．

5. 37 ° Cで30分間インキュベートする．
6. 反応液にローディングバッファーを加え，0.5 µg/mlエチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲル上のラージウェル (0.5〜1.0 cm幅) にこのサンプルの全量をアプライする．ニックの入ったプラスミドやスーパーコイル状のプラスミドから直鎖状プラスミドが完全に分離するまで電気泳動する．隣のレーンに未切断のベクターDNAを一緒に泳動すると，未消化のプラスミドと直鎖状プラスミドDNAを識別しやすくなる．
7. 長波UV光源でDNAバンドを視覚化し，清浄なかみそり刃を使ってゲルから目的のバンドを切り出す．
8. ゲルスライスからDNAを回収する．これを行うにはSpinPrep Gel DNA Kit (カタログ番号 70852-3) が適している．最終産物を30 µl (通常，DNA約50 ng/µl) にする．ライゲーションステップのため，回収率が50%の範囲内にあると仮定する．
9. 処理したベクターを，使用時まで-20 ° Cで保存する．

注: ベクターがゲル精製されない場合，またはゲル回収法で残留アルカリホスファターゼが除去されない場合は，反応液を1倍量のTE飽和フェノール，1倍量のフェノール:CIAA (1:1; CIAAはクロロホルム:イソアミルアルコール, 24:1)，および1倍量のCIAAで順次抽出します．次に，0.1倍量の3 M 酢酸ナトリウムと2倍量の100%エタノールで沈殿させます．12,000 x gで10分間遠心し，ペレットを70%エタノールで洗浄して風乾し，30 µlのTEバッファーにとかします．

E. インサートの調製

インサートは，制限酵素で消化したのちゲル精製することにより，簡単に調製することができます．ただし，同じ選択マーカーを使ってベクターからpETベクターにサブクローニングする場合には (下記に示したPCRを用いる場合でも)，高効率で形質転換するオリジナルのプラスミド(非常に効率的に細胞へ導入される)を除去するために，目的のフラグメントをゲル精製する必要があります．10 pgのスーパーコイル状プラスミド (アガロースゲルで検出可能な量よりも少ないDNA) が混在するだけで，一般に，目的のpETサブクローンを含むコロニーよりもオリジナルのプラスミドを含むコロニーの方が数多く形成されてしまいます．

PCRは，目的遺伝子をpETプラスミドでの発現用に分離あるいは修飾する目的で用いられます．この方法では，適切なプライマーをデザインすることにより (1) cDNA配列の翻訳部分だけを単離したり，(2) 便利な制限酵素切断部位を導入したり，(3) LIC突出末端を付加したり，(4)適切なリーディングフレームにコード領域を配置することが可能です．一般的に，プライマーはGC含量約50%の目的の配列に相補的な最低15個 (望ましくは18〜21個) のヌクレオチドをもち，効率的な消化が行われるように制限酵素認識部位の5'末端側に3〜10個 (酵素により異なる) の“ スペーサー ”ヌクレオチドをもつている必要があります．

PCRを用いてインサートを調製するリスクの1つとして，突然変異を誘発する可能性が挙げられます．このPCR反応のエラー発生率を最小限に抑えるいくつかの方法があります．

- 校正活性をもつポリメラーゼを使用する．
- PCRサイクル数を制限する．
- 目的DNAの濃度を高める．
- プライマー濃度を高める．

III. pETベクターでのインサートのクローニング

本項では，インサートをpETベクターにクローニングするプロセスについてご説明します．このプロセスには，ライゲーションおよび非発現宿主の形質転換，および構築物の解析を含みます．NovagenのClonables Kit (カタログ番号70256-3) は，予備検査済みのライゲーション用混液と高効率のコンピテントセルから成り，インサート(どのような末端をもつインサート)とベクターのライゲーションおよび形質転換が簡便かつ再現性よく行えるように設計されています．プロトコールは，TB233 (Clonables Kitに添付) を参照してください．構築物を確認した後，プラスミドをタンパク質産生用の発現宿主に形質転換します．

A. ライゲーション

優れた結果が安定して得られているライゲーション用プロトコールの1例を下記に示します．

1. 2～4塩基対の粘着末端をもつDNAフラグメントを用いた標準的な反応では，50-100 ng (0.015～0.03 pmol) のpETベクターと0.2 pmolのインサート(500 bpのフラグメント50 ng) を20 µlの反応液中で使用する．下記の成分を1.5 mlチューブに入れ (これらの成分は，DNALigation Kit，カタログ番号69838-3中に個別に含まれている)，リガーゼは最後に加える．

2 µl	10X Ligaseバッファー(200 mM Tris-HCl pH7.6, 100 mM $MgCl_2$, 250 µg/mlアセチル化BSA)
2 µl	100 mM DTT
1 µl	10 mM ATP
2 µl	50 ng / µlに調製されたpETベクター
1 µl	希釈バッファーで希釈したT4 DNA ligase(0.2-0.4 Weiss units/ µl)
X µl	調製された目的遺伝子インサート（0.2 pmol）
Y µl	ヌクレアーゼフリー水で液量を合わせる
20 µl	トータルボリューム

2. 最後にリガーゼを加えたのち，ピペットチップで穏やかに撹拌混合する．16 ° Cで2時間から一晩インキュベートする．非組換え体バックグラウンドを確認するために，インサートを含まない反応液を用いてコントロール反応も並行して行う．

注: 平滑末端をもつインサートの場合では，10倍以上のリガーゼ (未希釈のリガーゼなど) を使用し，ATP濃度を0.1 mMに下げ，16 ° Cで6～16時間，または室温で2時間インキュベートします．

B. 形質転換

最初のクローニングは，NovaBlueのようなrecA⁻クローニング株か，T7 RNAポリメラーゼ遺伝子を欠く類似の宿主で行う必要があります．これにより構築物の配列の決定に適したモノマープラスミドが高い収率で得られ，また，クローニングと発現を分離することができます．クローニングと発現の分離は，のちの操作で生じる恐れがある問題の解決にきわめて有用です．

pETベクターを用いたクローニング・発現用の上記菌株から，標準的な方法により形質転換用コンピテントセルを調製することができます．BL21とその誘導株では，他の菌株に比べて形質転換効率が1/10程度と予想されます．Novagenでは高効率の形質転換を簡便かつ安定に行えるように，それらの菌株のコンピテントセルをご用意しております．

高品質の試薬から成るライゲーション反応液中のDNAであれば，Novagenのコンピテントセルにそのまま添加して形質転換を行うことができます (ただし細胞20 µl当たり1 µl以上のライゲーション反応液を使用してはなりません)．形質転換前にリガーゼを失活させる必要はありません．標準的なミニプレップ法で単離したプラスミドDNAでも通常は差し支えありませんが，最大の形質転換効率を得るには，フェノール，エタノール，塩類，タンパク質，および界面活性剤を含まないサンプルDNAを，TEバッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) または水に溶解する必要があります．

Novagenのコンピテントセルは0.2 mlで提供されています．通常の形質転換反応では20 µl使用しますので，各チューブには10回分の形質転換反応に充分な量が含まれています．Singles コンピテントセル

は50 µlずつに小分けされていますので，分注することなくそのまま使用することが出来ます．製品に同梱されているプロトコール中では，Singlesコンピテントセルと，通常のコンピテントセルとで，操作が異なることにご注意ください．NovagenのNovaBlue及びBL21(DE3)コンピテントセルは，HT96コンピテントセルとしてハイスループットに対応する96穴プレートのタイプもあります．（テクニカルブリテン313参照.）

取り扱い上の留意点

1. 商品を受け取った際には，まず，コンピテントセルがまだ凍結状態にあり，配送容器内にドライアイスが残っていることを確認してください．ただちにコンピテントセルを-70 °C以下のフリーザーに移してください．最適な結果を得るには，使用前に細胞を決して融解しないことが肝要です.
2. 細胞が温まらないよう，チューブの上部またはキャップのところをおもちください．可能な限り氷中に置いてください.
3. 細胞を混合する時は，チューブを指で1～3回はじいてください．コンピテントセルには，ボルテックスを決してかけないでください.
4. 0.2 ml容量の細胞の場合では，凍結融解の反復を避けるため，最初に融解した際に少量ずつ小分けにして-70 °C以下で保存してください (Singlesコンピテントセルの場合はあらかじめ50 µlずつ小分けにしてありますので“そのまま”使用でき，分注の手間が必要としません) . 0.2 mlストックから細胞を分注する際は，ストックチューブをすばやく氷中から取り上げ，指で1～2回はじいて混合してからチューブを開けます．細胞懸濁液の中ほどから20 µlを抜き取り，速やかにチューブを氷中に戻します．抜き取った液は，予冷しておいた1.5 mlチューブの底に速やかに移し，1回ピペッティングして混合し，ただちにチューブにキャップをして氷中に置きます．すべての分注が終わったら，形質転換操作を進める前に使用しないチューブをフリーザーに戻します.

操作

適切な抗生物質を含むLB寒天プレートをあらかじめ用意しておきます

1. 適切な本数のコンピテントセルチューブをフリーザーから取り出す (必要に応じ，Test Plasmidポジティブコントロール用のサンプルをもう1本追加する) . ただちにチューブを氷中に置き，キャップ以外はすべて氷でおおう．また，必要な本数の空の1.5 mlポリプロピレン製微量遠心チューブを氷中に置いて予冷する．氷中に2～5分静置して細胞を融解する.
2. 細胞が融解したことを目視で確認し，指で軽く1～2回はじいて細胞を均一に懸濁する.
3. *通常の形質転換反応*: ピペットを用いて予冷したチューブに細胞懸濁液を20 µlずつ移す.
   Singlesコンピテントセル: 誘導コントロールの必要性に応じてStep4または5へ進む。
4. (任意) 形質転換効率を測定する場合は，0.2 ng (液量1 µl)スーパーコイル状プラスミド(またはコンピテントセルに添付されているTest Plasmid) を，細胞の入ったチューブの1本に添加する．穏やかに混合する.
5. 細胞懸濁液に1 µlのライゲーション反応液または精製プラスミドDNAを加える．穏やかに混合し，チューブを氷中に戻してキャップ以外の箇所はすべて氷でおおう．この操作を，他のサンプルについても繰り返す.
6. チューブを氷中に5分間置く.
7. チューブを42 °C の水浴に浸し正確に30秒間熱処理する．この際，振とうを行ってはならない.
8. チューブを氷中に2分間置く.
9. *通常の形質転換反応*: 室温のSOC培地80 µlを添加する．全てのチューブに培地を入れるまで氷中に置いておく
   Singlesコンピテントセル: 室温のSOC培地250 µlを添加する．全てのチューブに培地を入れるまで氷中に置いておく
10. 形質転換体の選択はプラスミドがコードしている薬剤耐性に適合する抗生物質を含むプレート上で行います．ホスト株特異的な抗生物質もホスト株の特性を維持するために必要なことがあります（15ページ参照）

NovaBlueを使用する場合: β-ラクタマーゼ選択を行う場合 (carb^R/amp^R) は，前培養 (振とう培養) のステップは必要ないが，前培養を30～60分間行うとクローニング効率が多少向上する．5～50 µlの細胞懸濁液を選択培地にプレーティングする（ステップ10）．カナマイシン耐性で選択を行う場合は，37℃，250 rpmで30分間振とうしたのち，選択培地にプレーティングする．

NovaBlue以外の株を使用する場合: 37℃，250 rpmで60分間振とうしてから選択培地にプレーティングする．

注: 前培養は，試験管ラックを固定した振とう培養機で行うのが便利です．各形質転換チューブを，ラック内の13 mm x 100 mmの空のガラス製試験管にセットします．形質転換チューブにはスナップキャップが付いているため，チューブが試験管の底に落下することはなく，すべての形質転換チューブを垂直に保つことができます．前培養している間に (前培養しない場合はそれ以前より)，プレートを37℃に置きます．プレート内に水分が多い場合は，クリーンベンチ内でフタ側を上にして置き，フタを1/3程度開けて30～45分間放置し，プレートを乾燥させます．プレートを乾燥させる必要がない場合は，フタは閉めたまま倒置して，37℃のインキュベータ内でプレーティング前に20分間ほど放置します.

11. 各50 µl (スーパーコイル状のTest Plasmidの場合は5 µl)の形質転換液を，適切な抗生物質を含むLB寒天プレート上に塗抹する（8ページと16ページ参照）．25 µl以下を播く場合は，まずプレート上にピペットでSOCの“プール”(液滴)を作り，このSOC の中に細胞懸濁液を加える.プレーティング法の詳細については，次の項を参照してください．

重要: プレーティングに適した形質転換混液の量は，ライゲーションの効率とコンピテントセルの効率によって異なります．高効率の条件下では (たとえば，4 x 10^8 cfu/µgを上回る形質転換効率が得られるNovaBlue細胞を使用した場合は)，2 µlというわずかな液量でも数百個の形質転換体が得られます．NovaBlueを用いて形質転換を行った場合は，特定のインサートおよびライゲーション効率に応じて10^5～10^7 transformants/µg plasmidの形質転換効率を得ることが期待されます.

Test Plasmid を使用した場合，50 µg/ml カルベニシリンまたはアンピシリンを含むLB 寒天プレート上のSOCプールに，5 µl以上の最終形質転換液(たとえば，1 x 10^6の効率で形質転換された5 µlのNovaBlue細胞) を加えないようにしてください．Test Plasmidはamp^R 遺伝子をもっているからです．

12. プレートをベンチ上に数分放置して過剰な液をプレートに吸収させた後，倒置して37℃で一晩インキュベートする．

プレーティング法

1. インキュベータからプレートを取り出す．25 µl以下の形質転換液を播く場合は，プレート表面にコロニーが均等に分布するように，SOCプールに播くことを勧める．滅菌したピペットチップで40～60 µlのSOCをプレート中央部に滴下し，プレーティングクッションとする．
2. 形質転換チューブを指で5～8回はじいて液を混合し，キャップを開けて形質転換反応液の中ほどから，適量のサンプルをすばやく採取する．
3. 採取したサンプルは，プレート上のSOCクッション内に加える．同じピペットチップを使ってサンプルと同量のSOCをクッションの縁部から吸い上げ，このSOCを再びクッション内に戻す．(この操作によりピペットチップを効果的にリンスすることができる．)

ColiRollers Plating Beads

ColiRollersを使うには，プレート毎に10～20のビーズを入れるだけである．形質転換混液をプレート上にピペットで滴下する前または後にビーズを入れる．プレートをカバーで覆い，前後に数回動かすと，ビーズが転がることによって，細胞が分散する．いくつかのプレートを重ねて，同時に揺することもできる．全てのプレートに細胞を塗沫したら，回収容器にプレートを倒置してColiRollersを捨てる,蓋をする.(上記の12の手順参照).

ColiRollers Plating Beadsは表面処理したガラスビーズで，これを用いると，スプレッダーやアルコール炎を使用しなくても，細胞を損傷することなく均一にしっかりと分散させることができます．

標準的なスプレッダー

スプレッダー（折り曲げたガラス棒，またはこれに相当するもの）をエタノールに完全に浸し，火炎滅菌する．炎が消えたら10秒ほど冷却時間をおいてからスプレッダーをプレート上に置く．スプレッダーはLB寒天プレートの端の方に置く（細胞プールには触れないようにします）．この操作により，細胞を塗り広げる前に，スプレッダーをLB寒天上でさらに冷却できる．スプレッダーを支えながら，プレートをゆっくりと回転させる．

重要: *塗抹棒を押し付けてはなりません ― 細胞を塗り広げられるだけの圧があれば充分です.*

サンプルがプレート上に均一に分布するまで塗り広げる．プレートが適度に乾燥していれば，サンプルとクッションは速やかにプレート内に吸収される．水分が吸収されたら塗抹を止める．プレートが湿っている場合は，サンプルが均一に分布するまで塗り広げる．過度な塗抹は形質転換効率を低下させるので，サンプルとクッションがプレートに完全に吸収されるまで塗抹しつづけることは好ましくない．短時間塗布したのち，プレートを上にむけて置いて室温で15分ほど放置してから37℃のインキュベータに移す．この操作により，余分な水分をプレートに吸収させることができ，その後プレートをインキュベータ内に倒置する(ステップ7)することができる．

すべてのプレートを，37℃のインキュベータ内に倒置して15～18時間培養する．さらに大きなコロニーを作る場合は，培養時間を少々 (1～2時間) 延長する．ただし，培養時間を長くすると(37℃，36時間以上)， サテライトコロニーが形成される確率が高くなる ので，注意を要する(カルベニシリンまたはカナマイシンを使用した時は，一般にサテライトは形成されない)．コロニーが適当な大きさに達したら，プレートを4℃に移す．

C． pET組換え体の分析

サブクローニングが成功している場合は，通常，インサート存在下でのライゲーションに由来するコロニーの方がネガティブコントロールとのコロニーよりもかなり多く生成されます．しかし，2つのプレートのコロニー数がほぼ同じであっても，クローニングが成功している場合もあります．形質転換体の分析方法には，コロニーPCR，プラスミドミニプレップ・制限酵素分析，シークエンシング，*in vitro* 転写・翻訳など，いくつかの方法があります．

コロニーPCRを行えば，プラスミドを単離するためにコロニーを生育させる前に，適切なインサートの有無とその挿入方向を直接調べることができます．このステップの追加は，“きたない”(多くの余分なバンドが含まれている)，未精製のPCR産物をクローニングしたに特に有効です．インサートの方向とサイズを調べるには，ベクター特異的プライマーの1つ(5 pmol ; 1 µl) と，インサート特異的PCRプライマーの1つ(5 pmol) をそれぞれ対にして用いて，2つの反応を行います．ほとんどのpETベクターでは，5' および3' ベクター特異的プライマーとして，それぞれT7プロモータープライマー (カタログ番号69348-3) およびT7ターミネータープライマー (カタログ番号69337-3) が適しています．一方，インサートの挿入方向を調べる必要がなければ，2つのベクター特異的プライマーのみを使って1つの反応を行うだけで済みます．

重要: *NovaTaqDNAポリメラーゼを使ってpET CBDベクターのCBD・Tagを効率的に増幅させるには，PCR反応混合液の最終濃度が8～10%になるようにグリセロールを添加しなければなりません．*
ASCBDcexプライマーやCBDclos・Tagプライマー，CBDcenA・Tagプライマー等の，CBDの一部分だけを増幅するプライマーを用いる場合には，必要ありません.

EcoProを用いたpET 組換え体の転写/翻訳分析

EcoPro T7 Coupled Transcription/Translation System (カタログ番号70876-3) を用いれば，目的タンパク質の発現のために構築されたpET構築物を迅速に評価できます．EcoPro システムは，他メーカーの*in vitro*発現システムと比較して完全長のタンパク質の収率をあげるために特別に調製された大腸菌抽出液を使用します。このシステムは，スーパーコイル状またはPCR産物などの直鎖状DNA テンプレートから直接，*in vitro*タンパク質合成が効率的に行われるように設計されています(McCormick and Ambuel, 2000)．PCR産物はライゲーション反応またはテンプレートとしてのコロニーを用いて調製されます．コロニーを使用する方法は，PCRによって不都合な停止コドンが導入されてしまったクローンを迅速にスクリーニングできるため，目的の塩基配列をPCRでクローニングした場合に特に有用です．合成されたタンパク質は^{35}S-メチオニンでラベルしたり，タグ特異的または目的タンパク質特異的抗体を用いてウェスタンブロットによって検出したり，FRETWorks S・TagまたはS・Tag Rapid Assay Kitを用いて定量することができます．

プラスミドテンプレート

EcoProに使用するDNAテンプレートは，実質的にRNase，$Mg2^{+}$，塩類を含んでいないことが必要です．Mobius 1000 Plasmid Kit (カタログ番号70853-3) で単離したプラスミドは本質的にRNaseを含んでいないため，さらに精製することなくそのまま転写/翻訳反応に供することができます．RNase Aを使用する他のプロトコールで作製したプラスミドDNAは，フェノール抽出して沈殿させます．TEを加えて100µlとし，TE飽和フェノール：CIAA（1：1；CIAAはクロロホルム：イソアミルアルコールが24：1混液）で2回，CIAAで1回抽出します．最終的に得られた水相を新しいチューブに移し，0.1倍量の3M酢酸ナトリウムおよび2倍量のエタノールを添加します．混和して-20℃で30分間静置し，12,000×gで5分間遠心して上清を除き，ペレットを70%エタノールでリンスします．風乾後，得られたDNAを30µlのTEに懸濁します．必要であれば，抽出前にTEバッファーと一緒に2µl のPellet PaintまたはPellet Paint NF Co-precipitantを添加することで，DNAの回収率を上げることができます（但し，Pellet Paintを使用する場合は，-20℃でのインキュベーション操作が省略できます)．

注: 市販のプラスミドDNA単離キットの中には，NovagenのMobius やUltraMobius Plasmid kitとは違って，精製中にRNaseを完全には除去できないものもあります．したがって，そのようなキットを使用する場合は，一般に上記のようにフェノールでDNAを抽出するのがもっとも安全です.

テンプレートとして直鎖状プラスミドを用いる場合は，平滑末端または5' 突出末端を作る制限酵素を用いてプラスミドを直鎖化することをお勧めします．3' 突出末端をもつテンプレートは，T7 RNAポリメラーゼによる転写が非コード鎖から誤って起こる場合があります．そしてこのアンチセンスRNAが目的転写産物とアニーリングして，EcoPro反応の際に翻訳を阻害する可能性があります．3' 突出末端を生成する酵素を使わざるを得ない場合は，25 µM dNTPs存在下でDNAポリメラーゼのKlenowフラグメントを作用させて (25℃，5分間，1 U/µg DNA)，DNA 末端を充填してから使用します．3' 突出末端を作る制限酵素の中でよく使われるのは*Pst* I，*Kpn* I，*Sac* I，*Sac* II，*Bst*X I，*Nsi* I，*Apa* I，および*Aat* IIです.

PCRテンプレート

転写/翻訳に適したPCR産物の調製には，正しい方向に挿入された目的インサートと同じ方向にT7プロモーター増幅が起こるようなプライマーを使用してください(下表参照)．この用途にT7プロモータープライマーは適しません．プロモーターが分子の末端に非常に近接している場合にはT7 RNAポリメラーゼの転写効率が低下するからです．pETUpstream Primerインサート特異的 3' プライマーを使用すれば，正しい方向に挿入されたインサートを選択的に増幅することができます．インサートを単一の制限酵素認識部位 (非指向性) にライゲーションした場合には，このような選択的増幅を行う必要があります．T7ターミネータープライマーは，目的遺伝子の非指向性特異的な増幅を目的とした3' プライマーとして適しています

*in vitro*転写／翻訳分析用プライマー

ベクター	5 ’ プライマー	3 ’ プライマー2
pET series[1]	pET Upstream Primer	T7 Terminator Primer
pET LIC Vectors	pET Upstream Primer	T7 Terminator Primer

1 pET-17b，20b(+)，23(+)，23a-d(+)を除く．プラスミドDNAをテンプレートとして使用.

2 ベクター特異的3 ’ プライマーがある場合には，両方のインサート方向を増幅.

重要: NovaTaqDNAポリメラーゼを用いてpET Upstreamプライマーで CBD・Tagを増幅させるには，PCR反応混合液の最終濃度が8～10%になるようにグリセロールを添加しなければいけません.

ライゲーションPCR による転写/翻訳分析用テンプレートの作製

ライゲーション反応は，PCRの後，EcoPro T7転写/翻訳を行うことで直接分析できます．但しこの方法では，個別のクローンを確認できないということに注意してください．個別のクローン分析には，コロニーPCRを使用してください．

1. 下記のライゲーションPCR用反応液を調製する．

1 µl	Ligation反応液，TEバッファー(10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA)で1:10に希釈した物(0.25-0.5ngベクター)
5 µl	10X Nova*Taq*バッファー($MgCl_2$含有)
1 µl	pET upstream primer (5 pmol)
1 µl	Downstream primer (5 pmol)
1 µl	10mM dNTP Mix
0.25 µl	(1.25U) Nova*Taq* DNA Polymerase
X µl	脱イオン滅菌水で液量を合わせえる
50 µl	トータルボリューム

2. 酵素またはDNAを最後に加えて，反応を開始させる．穏やかに混和し，蒸発を防ぐためミネラルオイルを200 µl ピペットチップから2滴滴下する．酵素またはDNAの添加前に反応液を80°Cに加熱しておくと，一般に最適な結果が得られる．
3. チューブをPerkin-Elmerサーマルサイクラーにセットし，下記の条件でPCRを30サイクル行う．
   - 94°Cで1分 間
   - 適切なアニーリング温度 (ベクタープライマーの場合は通常55 ° C)，1分
   - 72°Cで2分間
   - 72°Cで6分間の最終伸長
4. ミネラルオイルの除去と，ポリメラーゼを不活性化するため，100 µlのクロロホルムを加えて30秒混合し，1分間遠心する．DNA産物は，上層の水相 (混濁している場合があります) に含まれている．必要であれば，アガロースゲル電気泳動のために5〜10 µlのサンプルを分取する(詳細は32ページの「コロニースクリーニング」を参照) ．プライマーとプライマーの間の長さに相当する（プライマーを含んだ）サイズのバンドが強く現れるはずである．
5. EcoPro T7反応に用いる場合は，PCR産物を沈殿させて塩類を除去しておく必要がある．

   50 µlのPCR反応液を沈殿させる場合，5.2 µlの3 M 酢酸ナトリウムと115 µlの95%エタノールを加える．ペレットを可視化するために，2µlのPellet Paint(カタログ番号69049-3)またはPellet Paint NF Co-Precipitant(カタログ番号70748-3)を加える．尚，Pellet PaintはEcoPro T7反応に適応している．ボルテックスで軽く混和し，14,000×gで5分間遠心する．ペレットを70%エタノールで軽く洗浄し，次いで100%エタノールで同様に洗浄する．ペレットを乾燥させて残存するエタノールを除去し，50 µlの脱イオン水に溶かす．EcoPro T7反応には2〜4 µlを使用する．

コロニーPCRによる転写/翻訳分析用のテンプレートの作製

1. 200 µlのピペットチップまたは滅菌つまようじを使い，寒天プレートからコロニーを拾う．直径1 mm以上のコロニーを選び，できるだけ多くの細胞を採取する．コロニーのコピーを取りたい場合は，ピペットチップをプレートに接触させてから，コロニーをチューブに移す(ステップ2)．
2. 50 µlの滅菌水を入れた0.5 mlチューブに植菌する．ボルテックスで撹拌して，菌を懸濁させる．
3. チューブを沸騰水中または99°Cのヒートブロックに5分間置き，細胞を溶解してDNaseを変性させる．
4. 12,000×gで1分間遠心し，細胞残渣を除去する．
5. 上清10 µlをPCR用の新しい0.5 mlチューブに移す．使用時まで氷中に置く．
6. 下記試薬を混合してマスターミックスを調製する．

1反応当たり:

31.75 µl	滅菌水
1 µl	dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP各10mM)
1 µl	pET upstream primer, 5 pmol/ µl
1 µl	downstream primer, 5 pmol/ µl
5 µl	10X Nova*Taq*バッファー($MgCl_2$含有)
0.25 µl	(1.25U) *NovaTaq* DNA Polymerase
40 µl	トータルボリューム

ピペッティングによるロスを考慮して，X.5倍の分量で調製するとよい．Xは，反応の数をす．

7. 各サンプルにマスターミックスを40 µl加えて穏やかに混和し，ミネラルオイルを2滴し，チューブにキャップをしてサーマルサイクラーにセットする．(Perkin-Elmer)

注: 任意のステップとして，マスターミックスを加えるに細胞溶解サンプルを80°Cに加熱している場合はhot start法を行うこともできる．

8. サーマルサイクラー中で下記のプロセスを35サイクル行う．
   - 94°Cで1分間
   - 適切なアニーリング温度，1分 (ベクタープライマーでは通常55°C)
   - 72°Cで2分間
   - 72°Cで6分間の最終伸長
9. ミネラルオイルの除去と，ポリメラーゼを不活性化のため，100 µlのクロロホルムを加えて30秒混合し，1分間遠心する．DNA産物は，上層の水相 (混濁している場合があります) に含まれている．必要があれば，アガロースゲル電気泳動のために5〜10 µlのサンプルを分取する(詳細は32ページ「コロニースクリーニング」参照)．
10. EcoPro T7反応に用いる場合は，PCR産物を沈殿させて塩類を除去する．50 µlのPCR反応液を沈殿させる場合，5.2 µlの3 M 酢酸ナトリウムと115 µlの95%エタノールを加える．ペレットを可視化するために，2 µlのPellet Paint(カタログ番号69049-3)またはPellet Paint NF Co-Precipitant(カタログ番号70748-3)を加える．尚，Pellet PaintはEcoPro T7反応に適応している．ボルテックスで軽く混和し，14,000×gで5分間遠心する．ペレットを70%エタノールで軽く洗浄し，次いで100%エタノールで同様に洗浄する．ペレットを乾燥させて残存するエタノールを除去し，50 µlの脱イオン水に溶かす．EcoPro T7反応には2〜4 µlを使用する．

コロニースクリーニング

前の項で述べた通り，Novagenのベクター特異的プライマーを用いて直接コロニーPCRを行えば，ミニプレップを行わずに，インサートが導入されたプラスミドをもつコロニーをスクリーニングすることができます．*in vitro*転写/翻訳を行わずにコロニーPCRを行うためのプライマーとして，ほとんどのpETベクターでT7プロモータープライマーとT7ターミネータープライマー（それぞれ，カタログ番号69348-3および69337-3）が適しています．例外として，pET-17xb，pSCREEN-1b(+)，およびpEX*lox*(+)ベクターではT7プロモータープライマーよりもT7*gene10*プライマー（カタログ番号69341-3）の方が適しています．またpET-43.1a-c(+)およびpET-44a-c(+)では，T7プロモータープライマーよりもNus・Tagプライマー（カタログ番号70844-3）の方が適しています．

反応生成物（上記のコロニーPCRのステップ9で得た生成物）の分析法:

1. 100 µlのクロロホルムを加え，重層していたミネラルオイルを除去する．
2. 上層の水相に5 µlの10X ローディング用色素を加える．
3. 0.5 µg/ml エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルに，Perfect DNA Markersとともに上記サンプルをレーン当たり10～25 µlアプライする．

プラスミドDNAの少量調製法(ミニプレップ)

ポジティブクローンを同定後は，中コピーpETプラスミドDNAを単離でき，発現宿主への形質転換，制限酵素地図作製，塩基配列分析に利用できます．組換え体候補のプラスミドDNAを，*in vitro*転写／翻訳分析を用いて評価することもできます．*in vitro*での転写および翻訳では，テンプレートにRNaseが含まれていないことが重要です．Mobius KitまたはUltraMobius Kitで単離したプラスミドDNAには，本質的にはRNaseが含まれていません．しかし，SpinPrep Plasmid Kitや他のメーカー製のキットで単離したプラスミドDNAでは，RNaseを除去するために，29ページに記載した方法により更にフェノール：CIAA抽出を行う必要がある場合もあります．

中コピーはpBR322を元にした1細胞あたり20-60コピーをさします．多コピーはpUCを元にした1細胞あたり200コピー以上をさします。

Plasmid Preparation Kit	Scale	DNA Yield	Cat. No.	Size
Mobius 1000 Plasmid Kit	100 ml (high-copy) 250 ml–1.5 liter (mid-copy)	> 1 mg (high-copy) 200–1 mg (mid copy)	70854-3 70853-3 70853-4	2 rxn* 10 rxn* 25 rxn*
UltraMobius 1000 Plasmid Kit	100 ml (high-copy) 250 ml–1.5 liter (mid-copy)	> 1 mg (high-copy) 200–1 mg (mid copy)	70907-3 70906-3 70906-4	2 rxn* 10 rxn* 25 rxn*
Mobius 500 pET Plasmid Kit	500 ml culture	500 µg (low-copy)	70969-3	10 rxn
Mobius 200 Plasmid Kit	35 ml culture (high-copy or mid-copy)	> 200 µg (high-copy) > 30 µg (mid-copy)	70970-3	25 rxn
UltraMobius 200 Plasmid Kit	35 ml culture (high-copy or mid-copy)	> 200 µg (high-copy) > 30 µg (mid-copy)	71090-3	25 rxn
SpinPrep Plasmid Kit	1–3 ml culture	5–10 µg (high-copy) 0.25–1 µg (mid-copy)	70057-3 70851-3	20 rxn 100 rxn

*The kit sizes described are for the 100 ml (high-copy) or 250 ml (mid-copy) preparations. Additional buffers are required for > 250 ml (mid-copy) scale (Technical Bulletin 279).

シークエンシングテンプレートを沈殿させる場合には，Pellet PaintまたはPellet Paint NF Co-precipitantを添加すると沈殿後のペレットを目視で確認しやすくなります．ローダミンを用いる標識法（例：PE Applied Biosystems自動シークエンサー）にはPallet Paint NF（カタログ番号70748-3）が，Cy5標識自動シークエンサーにはPallet Paint（カタログ番号69049-3）が各々適応しています．

シークエンシング

二本鎖および一本鎖プラスミドテンプレートを使ったシークエンシングの詳細のプロトコールは，数多くのシークエンシングキットメーカーから入手することができます．シークエンシング用のプライマーは，www.novagen.comでご覧いただけるpETベクターマップに記載してあります．

一本鎖DNAテンプレートは，Strandase Kit（カタログ番号69202-3）を用いてPCR産物から調製することも，一本鎖ヘルパーファージを重感染させてファージf1複製開始点をもつpETプラスミドから調製することも可能です．pETベクターのf1複製開始点は，生成した一本鎖DNAがT7ターミネータープライマーとアニールするような方向に配置されています．必要なヘルパーファージ（R408株またはM13KO7株）や，感染およびDNA単離のプロトコールは，多くのメーカーから入手することができます．NovaBlue宿主株にはF ' があるので，ヘルパーファージ感染用として最適です．

IV. 目的遺伝子の発現

A. 発現用宿主の形質転換

発現用宿主（λDE3溶原菌）の形質転換は，適切なコンピテントセルを入手または作製し，滅菌水またはTEバッファーで50倍希釈したプラスミド溶液1 µl (約1 ng) を用いて，26ページの形質転換の手順に従って行ってください．形質転換体を画線培養して単一コロニーを取得したら，22ページの記載されている方法に従ってグリセロールストックを調製します．

B. λDE3溶原菌の発現誘導

目的プラスミドが λDE3溶原菌に導入されると，増殖中の培養液にIPTGを加えることにより目的DNAの発現を誘導することができます．“ 普通の ” T7プロモーターしかもっていないpETベクターの場合では，完全な発現誘導には最終濃度0.4 mMのIPTGの使用が適していますが，T7*lac*プロモーターをもつベクターの場合は，完全に発現誘導するのに1 mMのIPTGを使用することが望まれます．誘導プロトコールの1例を下記に示します．小スケールの誘導，分画，および発現の分析に関する詳細なプロトコールは，VI項の「目的タンパク質の精製」に記載されています（42ページ）．

すべてのDE3宿主株では，発現誘導のために添加するIPTGの濃度を変えるだけで発現レベルを厳密にコントロールすることができます．Rosetta(DE3) およびTuner(DE3) ， Origami B(DE3) 株は，*lacY1* 変異が入っているため*lac*パーミアーゼを介した細胞内へのラクトースの取り込み活性が除かれています。そのため，これらの株は培地中のラクトースに対する感受性低く，IPTGが培地中の全ての細胞に均等に浸透します．最良の結果を得るためには，IPTG濃度を25 µMから1 mMまで試験してIPTGの至適濃度を決定しておく必要があり，また目的タンパク質の活性および溶解性を検討しておく必要もあります．

誘導前の準備

新しく画線培養したプレートから単一コロニーを採取し，250 ml Erlenmeyerフラスコ中の，適切な抗生物質を含むLB培地50 mlに植菌する． (通気を良好に保つために，培地はフラスコの総容積の20%までとする．)

オーバーナイト培養は避けてください。基底発現レベルの上昇(22ページを参照)や培地中の抗生物質の枯渇(38ページを参照)が引き起こされる可能性があります。もし，オーバーナイト培養となる場合には，培地に0.5-1%グルコースを添加することによって誘導前に発現する目的タンパク質レベルを下げることができます。

別法として次の方法を用いることも可能です．単一コロニーまたは数 µlのグリセロールストックを，適切な抗生物質を含むLB培地2 mlに植菌する．37°CでOD$_{600}$が0.6～1.0に達するまで振とう培養する．この培養液を4°Cで一晩保存し，翌朝，遠心 (微量遠心で30秒) して集菌する．抗生物質を含む新しい培地2 mlに懸濁し，ここから50 mlの培地に植菌する．

誘導プロトコールの例

1. OD$_{600}$が0.4～1 (0.6が望ましい; 約3時間) に達するまで，37°Cで振とう培養する．
2. （任意）非誘導のコントロール用および下記の「プラスミド安定性試験」（38ページ）用（T7*lac*プロモーターのプラスミドには推奨しません）に，培養液の一部を採取する．残りの液にIPTGの最終濃度が0.4 mM (T7プロモーターの場合)または1 mM (T7*lac*プロモーターの場合) となるように100 mM IPTGを加え，さらに2～3時間培養を続ける．
3. フラスコを氷中に5分間置き，4°C，5000×gで5分間遠心して集菌する．必要があれば，分析用として上清を保存する．培地画分の分析については，VI項の「目的タンパク質の精製 」参照．
4. 培養液体積の0.25倍量の冷却した20 mM Tris-HCl pH 8.0に懸濁し，上記と同様の遠心操作を行う．
5. 上清を除去し，精製を継続するか，ペレットのまま-70°Cで凍結保存する(フリーザーでの保存期間が長くなるほど Inclusion body の溶解性が低下するので注意) .

注: pLysSまたはpLysEをもつ菌の場合は，融解時に菌体の溶解が起こります．

V. 発現の最適化

このあとの項では，目的タンパク質の発現の最適化に関する方法と留意点についてご説明します．この項では，プラスミドの安定性，タンパク質の溶解性，および目的遺伝子の発現に影響を及ぼす因子の考察をします．

A. 可溶性およびフォールディングの促進

大腸菌に発現させた組換え体は，多くの場合，封入体とよばれる凝集体として産生されます．封入体が形成されても，通常，目的タンパク質の一部は細胞内で可溶性です．pETシステムでは発現量が多いため，目的タンパク質のほとんどが凝集した場合でも，有意な量の可溶性タンパク質が存在する場合があります．一般的に，低い誘導温度や最少培地での培養といった，タンパク質合成速度を抑制するような条件では，可溶性の目的タンパク質濃度が上昇します．

多くの用途では，目的タンパク質を可溶で活性をもつ状態で発現させることが望まれます．次項では，目的タンパク質の可溶性を高めるためのいくつかのアイデアについてご説明します．溶解しているからといって，タンパク質が必ずしも正しくフォールドしているとは限らないことに注意してください．事実，溶解していても不活性な状態で発現するタンパク質もあります．ベクター，宿主，タンパク質配列，培養条件の全てが関与することによって，可溶性または不溶性のタンパク質が増加もしくは減少します．

温度

37℃で培養すると封入体として蓄積されるが，30℃で培養すると可溶性で活性をもつタンパク質として誘導されるものもあります（Schein and Noteborn, 1989）．多くのpETベクターに存在するシグナル配列リーダーを利用して目的産物を分泌させたい場合には，25℃または30℃で増殖・誘導させるのが最適と思われます．低温（15-20°C）で長時間（一晩）誘導すると，可溶性タンパク質の収量が増す場合もあります．

溶解バッファー

目的タンパク質が可溶性画分に分配されるか不溶性画分に分配されるかは，溶解バッファーの性質によって大きく左右されます．疎水性領域または 膜結合領域をもつタンパク質は，1X His・Bind Binding Buffer (500 mM NaClを含む) のような標準的な溶解バッファーを使用した場合，不溶性画分に分配される可能性がありますが，封入体に取り込まれる可能性はあまりありません．タンパク質が菌の脂質や膜と会合することが原因で不溶性画分に分配されている場合は，溶解バッファーに非イオン性または両性界面活性剤をmM濃度加えることで，可溶性画分に移行することがあります．BugBuster Protein Extraction ReagentやPopCulture Reagentは，rLysozyme Solutionと組合わせて用いることができ，可溶化するのに効果的です．細胞壁や細胞膜の成分を溶解する非イオン性と両性イオン界面活性剤混合物を独自に配合することにより，細胞内タンパク質を変性させずに遊離できます．BugBusterおよびPopCulture中の界面活性剤は，他の膜結合タンパク質や疎水性タンパク質の可溶化も促進します．これらの膜タンパク質の可溶化には，他の界面活性剤を用いることもできますが，多くが可溶化しない可能性もあります．可溶化のための界面活性剤は，まだ実験的に選ぶしかありません．菌体溶解における界面活性剤の使用については，“ 実験2: ラット肝インスリン受容体の可溶化と精製 (Experiment 2: Solubilization and Purification of the Rat Liver Insulin Receptor) ” (Brennan and Lin, 1996) を参照してください．しかし，界面活性剤の添加は，以降の精製過程に影響を与える可能性があることに注意してください．

強く荷電した領域をもつ目的タンパク質の場合でも，他の細胞成分に会合している可能性があります (たとえば，塩基性タンパク質はDNAに結合している可能性があります) ．このような場合，目的タンパク質は主として細胞残渣とともに分画されます．理論上は，溶解バッファーへ塩の添加や，Benzonase Nucleaseのようなヌクレアーゼによる核酸の分解（テクニカルブリテン261参照）により解離させることができます．

ペリプラズム局在

活性をもつ可溶性タンパク質を得る他の方法としては，ジスルフィド結合の形成やフォールディングに好ましい環境であるペリプラズムへ輸送するベクターを使用することです(Rietsch et al., 1996; Raina and Missiakas, 1997; Sone et al., 1997)。このためには，シグナル配列を融合できるpET-12および 20, 22,

25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 40などのベクターを使用します．CBDcenA シグナル配列によってペリプラズムへ輸送される目的タンパク質は，精製時に培養液中へ漏れることがあります(Novy et al., 1997)。しかし，この手法が適さない目的タンパク質があることにご注意ください．たとえば，β-gal をペリプラズムタンパク質に融合させたものの中には，毒性を示すものがあります (Snyder and Silhavy, 1995)．また成熟型タンパク質のN末端アミノ酸のチャージによっては移行を阻害します(Kajava et al., 2000).

融合用のシグナル配列をもつpETベクターは多数ありますが，pET-39b(+)およびpET-40b(+) は，ペリプラズムでそれぞれジスルフィド結合の形成 (DsbA) または異性化 (DsbC) を触媒する酵素との融合を行うようにデザインされています (Missiakis et al., 1994; Zapun et al., 1995)．融合タンパク質がペリプラズムに局在できれば，タンパク質に直接連結している酵素によって溶解性が増大され，ジスルフィド結合の形成が促進されます．活性の発現にジスルフィド結合の形成を必要とする正しく折りたたまれた融合タンパク質(DsbAとの融合タンパク質)が単離されています (Collins-Racie et al., 1995)．過剰発現した精製DsbC酵素は酸化状態では分離され，*in vitro*でジスルフィド異性化酵素活性を得るには還元剤 (0.1～1.0 mMのDTT) で処理する必要があることにも注意が必要です (Joly and Swartz, 1997)．一般的に，pET-40b(+) から発現されたDsbC融合タンパク質は，まずHis・BindまたはNi—NTA His・Bindクロマトグラフィーで精製します．融合タンパク質を還元剤で処理する前に，EDTAを最終濃度1 mMとなるように添加するか，サンプルを透析して残存する$Ni2^{+}$を除去する必要があります．精製にNi-NTA His・Bindレジンを用いた場合は，おそらくEDTAの添加や透析の必要はありません.

細胞質内局在

Trx・Tag，GST・Tag ，Nus・Tag融合タグは，目的タンパク質の可溶性を高めることのできる高溶解性のポリペプチドです．細胞質発現用に設計されたベクターを用いると，大腸菌細胞質内でジスルフィド結合を形成可能な宿主において，フォールディングが改善されます（以下の「宿主株」参照）．部位特異的プロテアーゼの認識配列をこれらベクター全てに組込んであるので，タグを完全に取り外すことができます（10ページ参照）.

住血吸虫のグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（GST）は，大腸菌中でタンパク質を発現する際に，N末端融合パートナーとしてよく用いられます．この目的のために特別に設計されたわけではありませんが，GST・Tagが融合パートナーの可溶性を高めることが報告されています．pET-41a-c(+)およびpET-42a-c(+)ベクターは，トロンビン，エンテロキナーゼまたはFactor Xaで切断可能なGST・Tagをコードしています．これらのベクターはカナマイシン耐性をもつので，*trxB*変異をもつ宿主と一緒に使用することはお勧めできません.

大腸菌内で通常不活性な状態で産生される多くのタンパク質は，N末端チオレドキシン（Trx・Tag）配列と融合すると更に可溶化しやすくなる傾向があります（La Vallie et al., 1993; Novy et al., 1995）．pET-32a-c(+)ベクターから発現したTrx・Tagは，多くの目的タンパク質の可溶性を高めるだけでなく，*trxB*変異株の細胞質内にジスルフィド結合の形成を触媒するようです（Stewart, 1998）．pET-32a-c(+)は，細胞質内でジスルフィド結合の形成を促進する*trxB*/*gor*変異株のOrigami，Origami B，Rosetta-gami，Rosetta-gamiB各株と適合するので，これを組合わせれば，可溶性で活性をもち，正しくフォールドした目的タンパク質を，最大量産生させることができます.

pET-43.1a-c(+)およびpET-44a-c(+)ベクターにより，可溶性促進ペプチド，Nus・Tagを組込むことができます．Nus・Tagは，過剰発現時に最も可溶性の高い大腸菌タンパク質を系統的に探索して開発したものです（Davis et al., 1999; Harrison, 2000）．4つの異なるNusA融合タンパク質をそれぞれ用いたテストでは，目的タンパク質の85%以上が可溶化しました（Harrison, 2000）．pET-43.1a-c(+)およびpET-44a-c(+)ベクターも，細胞質内でジスルフィド結合の形成を大きく促進する*trxB*/*gor*変異株のOrigami，Origami B，Rosetta-gami，Rosetta-gamiB各株と適合します.

宿主株

多くのタンパク質では，正しいフォールディングおよび活性のためにジスルフィド結合が必要です．しかしながら，大腸菌の細胞質はジスルフィド結合の形成に最適な環境ではありません．Origami，Origami B，Rosetta-gami，Rosetta-gamiB，AD494，またはBL21*trxB*の各宿主株を使用すると，大腸菌細胞質内でジスルフィド結合の形成が促進されるため，産生される目的タンパク質の可溶性や活性に影響を及ぼすこともあります．AD494およびBL21*trxB*宿主株では，チオレドキシンリダクターゼ

（*trxB*）変異があります．Origami株，Origami B株，Rosetta-gami株，Rosetta-gamiB株では，*trxB*変異に加えてグルタチオンレダクターゼ（*gor*）変異があり，さらにジスルフィド結合の形成を増加させます．目的タンパク質がジスルフィド結合を含み，目的遺伝子が使用頻度の低いコドンをコードする場合には，Rosetta-gami株が最適と考えられます（以下の，「使用頻度の低いコドンの補正」参照）．目的タンパク質にジスルフィド結合が1つ以上必須ならば，pET-32a-c(+)ベクターと*trxB*または*trxB*/ *gor*宿主との組合わせが最適となるかもしれません．細胞質内でのジスルフィド結合の形成は，チオレドキシンの存在に依存しているとされるからです（Stewart, 1998）．15ページの「ジスルフィド結合の形成および可溶性の向上」も参照してください．

Tuner株およびその誘導株（Origami BおよびRosetta，Rosetta-gamiB）は，BL21の*lacY1*変異株で，培養液中で全細胞のタンパク質発現量を調節することができます． IPTG濃度を調節することで，非常に低いレベルから，pETベクターで十二分に強く誘導したレベルまで，発現量を制御することができます．低いレベルでの発現により，扱い難かった目的タンパク質の可溶性および活性が上昇することがあります．

B. 使用頻度の低いコドンの補正

ほとんどのアミノ酸は複数のコドンでコードされており，大腸菌コドンの使用頻度を分析することで，いくつかのコドンの使用頻度が低いことがわかります．特に，ArgコドンのAGA，AGG，CGG，CGA，IleコドンのAUA，LeuコドンのCUA，GlyコドンのGGA，ProコドンのCCCはほとんど使用されません．tRNA存在量はmRNA中のコドン傾向を厳密に反映しています．異生物種由来目的遺伝子のmRNAが大腸菌内で過剰発現した場合，使用頻度が低いまたは欠損しているtRNAが1つもしくはそれ以上要求されることがあり，コドン使用頻度の違いにより翻訳が妨げられてしまいます．tRNA量が十分にないと，翻訳の失速，途中での翻訳停止，翻訳フレームのずれ，間違ったアミノ酸の取り込みの原因となります。

使用頻度の低いコドンが少量存在しても，目的タンパク質の合成が大幅に減少することはありませんが，遺伝子中に数多くの使用頻度の低い大腸菌コドンクラスターをコードしている場合には，異生物種タンパク質の発現が非常に少なくなります．目的遺伝子中に使用頻度の低いコドンが多く使われ過ぎていても，プロダクトの断片化および発現の低下（Sorensen et al., 1989; Zhang et al., 1991）の原因となります．アミノ末端の近くに使用頻度の低いコドンが複数存在していると，この影響は最も大きく現れるようです（Chen and Inouye, 1990）．アルギニンコドンであるAGAおよびAGGが多用されていると，タンパク質収量がかなり低下することが，多くの実験によって示されています．これらのコドンがN末端の近くにあったり連続して存在したりする場合に，これらの影響は最大となるようです（Brinkmann et al., 1989; Hua et al., 1994; Schenk et al., 1995; Calderone et al., 1996; Zhan, 1996）．宿主内の使用頻度の低いコドンに対応するtRNAを増加させると，それらのコドンを含むタンパク質の収量が劇的に増加することが，いくつかの研究室により示されています（Brinkmann et al., 1989; Seidel et al., 1992; Rosenberg et al., 1993）．例えば，宿主に適合するプラスミドからAGAおよびAGGに対応するtRNAが余分に供給される株を使用した場合，ヒト由来プラスミノーゲンアクチベーターの収量が，約10倍に増加しています（Brinkmann et al., 1989）．他の使用頻度の低いコドンであるAUA，CUA， CCCまたはGGAに対応するtRNAを増加させることで，異生物種由来のタンパク質の収量や確実性をあげています。（Kane, 1995）．

Rosetta株は，使用頻度の低いArgコドンのAGA，AGG，IleコドンのAUA，LeuコドンのCUA，ProコドンのCCC，GlyコドンのGGAをもつ目的タンパク質の発現を促進するために設計されています．tRNAは，pETベクターと適合するクロラムフェニコール耐性プラスミド（pACYC骨格）上の内在性プロモーターから発現させます．pLysSを含むRosetta株は，T7リゾチームと同じ基本骨格に，使用頻度の低いコドンのtRNAをコードしています．Rosetta株は，lonおよびompTが欠損したB株からの誘導株です．RosettaBlue株およびRosetta-gami株は，K-12 NovaBlue株とOrigami株とからそれぞれ誘導され，その対応する株の特徴をもっています．RosettaBlueは，*lac*リプレッサー（*lacI*^{q}）の濃度が高いため，形質転換の効率および厳密性が高いという利点もあります．Rosetta-gami株は，ジスルフィド結合を形成させてタンパク質のフォールディングを促進する*trxB*/*gor*変異株です（15ページの「ジスルフィド結合の形成と可溶性の向上」を参照してください）．翻訳を妨げる使用頻度の低い大腸菌コドンを含む目的遺伝子からタンパク質の発現を促進するには，Rosetta株が非常に適しています（Novy et al., 2001）．

C. 毒性遺伝子とプラスミドの不安定性

プラスミドpBR322 とその誘導株の多く(pETベクターを含む) は比較的安定で，選択抗生物質の非存在下で多世代にわたって継代培養した後でも，かなりの割合で宿主菌に保持されています．しかし，宿主細胞にとって有害なタンパク質を産生する遺伝子をプラスミドに組み込んだ場合には，プラスミドの不安定化という問題が生じます．pETcoco　Systemは，pETcocoプラスミドのコピー数を1細胞あたり1コピーとすることで基底発現を最低レベルにまで抑えます．ほとんどの毒性遺伝子産物は，このシステムで安定化し発現させることができます（テクニカルブリテン333参照）.

pETシステムでは毒性遺伝子の発現によって，プラスミドの維持はできても宿主菌の増殖が阻害されることがあります．コピー数の減少や他の理由により，プラスミドを失った菌が出現する可能性が増大します．このような状況では，選択抗生物質がなくなるとすぐにプラスミドを失った菌が急激に過増殖してしまいます．大部分の菌にプラスミドを保持させておく場合には，そのプラスミドに対する選択抗生物質が存在しない条件下では宿主菌を生育させないことが重要です.

アンピシリンの使用

選択抗生物質としてアンピシリンを使用する場合は特別な注意が必要です．かなりの量のβ-ラクタマーゼが産生され，それが培地中に分泌されてアンピシリンを完全に分解してしまうためです．さらに，大腸菌の代謝によって培地が酸性になり，その培養条件ではアンピシリンが加水分解されやすいからです．したがって，不安定なプラスミドをもつ菌がアンピシリン選択下で生育しつづけられるのは，β-ラクタマーゼを分泌して培地中のアンピシリンが分解されるまでの間に限られることとなります．その後は，プラスミドをもたない菌が死滅することなく過増殖を始めてしまいます．1 ml当たり50 µgのアンピシリンを含む培地中における典型的なpBR322系プラスミド増殖の場合では，培養液がわずかに混濁した時点 (1 ml当たり約10^7個) で，この状態に達します．1 ml当たり200 µgのアンピシリンを添加しておけば，もう少し高い細胞密度になるまで選択を続けることができますが，β-ラクタマーゼの触媒活性を考慮に入れると，飽和密度に達するまで選択を維持できるだけの量のアンピシリンを培地に添加することは現実的ではありません.

さらにやっかいな問題は，ある種の毒性遺伝子は対数増殖期にはほとんど細胞に害を及ぼさず，飽和状態に達すると菌を死滅させることです．ほとんどの菌は飽和状態に達するまでプラスミドを保持しますが，培養を続けるほどプラスミドを保持している菌は減っていき，アンピシリンが枯渇するとプラスミドを失った菌が過増殖します.

選択条件下で飽和状態に達した培養液には，プラスミドを失った菌が実質的に過増殖している場合でも，すでにかなりの量のβ-ラクタマーゼが培地中に分泌されてしまっています．一般的には，新しいアンピシリンを含む培地中に1/200～1/1000量の飽和培養液を継代増殖することが可能です．しかし，飽和培養液は通常，かなりの量のβ-ラクタマーゼを含んでいるため，そのような希釈を行ってもβ-ラクタマーゼは充分に残っており，プラスミドを失った菌が死滅する前にすべてのアンピシリンが分解されてしまいます．そのため，継代した菌は，選択抗生物質の非存在下で完全に増殖することとなります．植菌する培養液に，すでにプラスミドを失った菌がかなりの割合で混在しているような場合，継代した菌が目的遺伝子の発現を誘導する密度まで増殖したころには，目的プラスミドをもつ菌の割合はきわめて低くなっている可能性があります．このような問題に注意を払わないと，実際には試験した培養液中のごく一部の菌にしかプラスミドが入っていなかった場合でも，目的の遺伝子は発現されにくいタイプであるといった間違った結論に達してしまいがちです.

単離，維持，および目的プラスミド発現のプロセスを通してプラスミドを最大限に保持するために，いくつかの簡単な対策を施すことをお勧めします．Novagenで実施した実験では，アンピシリンの代わりにカルベニシリンを使用することにより，プラスミドを失った菌の過増殖を抑制することが確認されています．この効果の一部は，カルベニシリンが低いpHでも優れた安定性を示すことに起因しています．このほか，アンピシリン耐性の代わりにカナマイシン耐性マーカー をもつpETベクターを選択する方法もあります．またアンピシリンで選択する必要のある培地を定常期（一晩；16時間）まで培養することは，選択を最大限維持するために避けてください．アンピシリン耐性と比較してカナマイシン耐性のもつ利点についての詳細は18ページの「抗生物質耐性」を参照ください.

グルコースの補給

毒性遺伝子をもつプラスミドは，T7 RNAポリメラーゼ遺伝子へのcAMP刺激により，培養液で一晩育成すると，λDE3溶原菌内で不安定化することがあります（Grossman et al., 1998）．一晩培養するのを避けるか，培地に0.5-1%グルコースを添加することでこの危険性は取り除けます．12ページの「グルコース含有培地」を参照してください．

プラスミド安定性試験

プラスミド安定性試験では，目的プラスミドを含む菌の割合および目的タンパク質の発現能を明らかにします．この試験は，T7プロモーターをもつpETプラスミドと，pLysSまたはpLysEをもたない宿主株にのみ適しています． T7*lac*プロモーター，pLysSプラスミド，pLysEプラスミドがある系では，この試験の信頼性はありません．pLysSまたはpLysEプラスミドを保持していたり，(無毒性の)目的タンパク質を問題なく発現するコロニーは，IPTG存在下でも増殖できるからです．pET-3ベクターやインサートの挿入がないT7*lac*プロモーターをもつベクター等の特定のベクターでは，IPTGはコロニー形成を阻害しません．pLysE存在下では，目的遺伝子産物が毒性をもたない限り，IPTGはコロニー形成を阻害しません．

選抜不足（特にamp^{R}プラスミド）と目的タンパク質の毒性との組合わせが，目的タンパク質を発現することも，維持することもできない菌が，培養液中に蓄積する原因となります．プラスミドが欠損している可能性があるので，誘導直前にプレーティングして培養液中の菌の組成を明らかにして下さい．この簡単な試験法によって，異常な誘導の原因を究明したり，最適レベル以下の発現量しかない菌の処理に無駄な労力を費やすことを避けることができます．プラスミドが不安定になる可能性があることに十分注意すれば，培養液中の98%以上の菌は，発現可能な目的プラスミドを通常含みます．通常，目的タンパク質が相当量蓄積する誘導後2〜3時間経ってから集菌しますが，プラスミド欠損または非生産性の菌を含む培養液を増殖させ過ぎるほどではありません．しかしながら，更に長時間蓄積し続けるタンパク質もあります．

目的プラスミドをもつ菌の割合を明らかにするために，4種類のプレートを用いた培養液の試験を誘導直前に行うことをお勧めしています．

プレート#	手法	意味付け
1	10^6倍希釈を寒天培地に塗沫	生育可能な全ての菌が増殖
2	10^6倍希釈を抗生物質含有培地に塗沫	プラスミドを保持した菌のみ増殖
3	10^5倍希釈を1mM IPTG含有培地に塗沫	プラスミドを欠損した菌または目的DNAの発現能が失われた変異株のみが増殖＊
4	10^5倍希釈を1mM IPTGおよび抗生物質含有培地に塗沫	プラスミドは保持しているが目的DNAの発現能が失われた変異株のみが増殖＊

＊ T7*lac*プロモーター，pLysSプラスミド，pLysEプラスミドまたはpET-3a-cを用いた場合には，プレート3および4の意味付けに信頼性はありません．

目的タンパク質の生産によく用いられる典型的な培養では，抗生物質もIPTGも含まないプレート上と，抗生物質のみを含有するプレート上では，ほぼすべての菌がコロニーを形成し，IPTGのみを含有するプレート上では2%未満の菌しかコロニー形成せず，抗生物質とIPTGを含有するプレート上では0.01%未満の菌しかコロニーを形成しません．目的プラスミドが不安定な場合，IPTG プレート上でのコロニー数の増大や，抗生物質プレート上でのコロニー数の減少によって，プラスミドを欠失した菌の割合を知ることができます．プラスミドは保持しているが目的DNAの発現能が失われてしまった突然変異体が出現する場合もありますが，それは比較的稀です．

プラスミドが安定であれば，特に注意を払う必要もなく目的遺伝子の発現を行うための培養を凍結ストックから始めることができます．新しい培地中の抗生物質が分解されていようと，飽和状態の培養液を一晩インキュベートしようと，ほとんどの菌は目的プラスミドを保持しています．しかし，目的プラスミドが不安定な場合や目的タンパク質の発現がみられない場合には，10^4倍以上の希釈率となるように8%グリセロール濃度で保存してある凍結ストックから新しい培養液に植え継ぎ，発現に使用する密度まで増殖させる必要があります．

グリセロールストック保存のためのamp^R pETベクター内の毒性遺伝子安定化

下記のプロトコールを用いれば，通常，アンピシリン耐性の機能的な目的プラスミドをもつ菌の割合を最大限に高めることができます．

アンピシリン耐性株の保存:

1. 形質転換プレート上のコロニーを50 µg/ml カルベニシリンを含む2 ml LBに植菌し，培養液がわずかに混濁するまで数時間培養する．
2. サンプルをカルベニシリンを含むプレート上で画線培養し，単一コロニーを得る．
3. コロニーが形成されたら (通常，37 ° Cで一晩) ，できるだけ速やかに50 µg/ml カルベニシリンを含む2 ml LB に植菌し，OD_{600} = 0.5に達するまで増殖させる．

ヒント:目的遺伝子が高い毒性を示すと考えられる場合，1%グルコースを含有するLB 寒天レートで画線培養すると，基底レベルの発現量を低下させることができます．

4. 培養液0.9 mlと80%グリセロール0.1 mlをクライオバイアルに入れて混合し，-70 ° C フリーザーで保存する．プラスミド安定性に疑問のある場合は，凍結時にプラスミド安定性試験 (34ページの「発現の最適化」参照) を行い，どの程度の割合の菌が機能的な目的プラスミドを保持しているかを確認する．

誘導時のamp^R pETベクター内毒性遺伝子安定化

下記の誘導プロトコールは，きわめて毒性の強い遺伝子をpET-22b(+)を用いて発現する場合にNovagenで行われている方法で，優れた実績があります．このプロトコールでは高濃度のカルベニシリンを使用し，発現誘導の前に培地を2回交換します．

毒性遺伝子の安定化：

1. 200µg/mlカルベニシリンを含む2ml TBに単一コロニーを接種する．OD_{600}=0.2～0.6に達するまで，37℃で増殖させる．
2. 遠心操作（微量遠心機で30秒）により集菌し，上清を除去して新しい培地2mlに再懸濁する．100µlのサンプルを，500µg/mlカルベニシリンを含む8ml TBに添加し，OD_{600}=0.2～0.6に達するまで，37℃で培養液を増殖させる．

   古い培地を除去することにより，分泌されたβ-ラクタマーゼも除去されます．
3. 1000×gで5分間遠心して集菌し，1mM IPTGと500µg/mlカルベニシリンを含む新しいTBに懸濁させる．30℃で2時間培養し，集菌する．

D. 発現に影響を与える他の因子

原核生物及び真核生物に由来する多種多様な遺伝子から充分量の目的タンパク質を発現させるためにこのT7発現システムが用いられてきました．しかし，ごく少量しか発現されないタンパク質もわずかですがありました．

目的タンパク質自体が，遺伝子の発現や細胞の機能を妨げている場合があります．目的タンパク質が蓄積するにつれてタンパク質合成速度が徐々にあるいは急激に低下したり，時には目的タンパク質が検出可能となる前にすべてのタンパク質合成が停止してしまうことが，パルス標識実験によって明らかにされている場合もあります．また培養中に宿主菌がかなり溶解してしまうこともあります．次の項からは低い発現レベルになりやすいまたは，低レベルになってしまう理由や，タンパク質発現を最適化するための推奨について短くまとめてあります．

Nエンドルール

目的タンパク質の安定性に影響すると思われるもう1つの要因は，N末端のメチオニンに隣接するアミノ酸 (末端から2番目のアミノ酸) です．この位置のアミノ酸は，N末端のfMetの遊離を決定しています．このプロセッシングはメチオニンアミノペプチダーゼによって触媒され，末端から2番目のアミノ酸の側鎖が大きいほど遊離の程度は低下するという関係があります (Hirel et al., 1989; Lathop et al., 1992) ．実際に著者らは，末端から2番目のアミノ酸がHis，Gln，Glu，Phe，Met，Lys，Tyr，Trp，Argの場合には，プロセッシングをほとんど認めていません．これら以外のアミノ酸がこの位置にある場合は，16%～97%がプロセッシングを受けます．

Tobias et al. (1991) は，タンパク質のアミノ末端アミノ酸とそのタンパク質の大腸菌中での安定性との

関係，すなわちN末端則について検討しました．彼らは，アミノ末端がArg，Lys，Phe，Leu，Trp，およびTyrの場合ではタンパク質の半減期がわずか2分であることを報告しています．これとは対照的に，検討したタンパク質のアミノ末端が上記以外のアミノ酸であった場合では，いずれも10時間を上回る半減期を示しました．

上記の試験を考え合わせると，末端から2番目の位置をLeuとするのは賢明な選択ではないと考えられます．なぜなら，末端から2番目のLeuは，fMet プロセッシングを受けるうえに，急速な分解のターゲットになる可能性が大きいからです．したがって，pETベクター から未融合の目的タンパク質産生に *Nde* I認識部位を利用する場合には，末端から2番目の位置にLeuコドンを選択することは避ける必要があります．クローニング部位として*Nco* I認識部位を用いる場合はこの位置のLeuコドンを利用することができません．末端から2番目のコドンはGから始まる必要があるからです．

セカンドサイトからの翻訳開始

時として，完全長の目的タンパク質以外に，短くなった発現産物が観察されることがあります．タンパク質の分解が考えられますが，第2の部位からの翻訳が開始されている可能性もあります (Preibisch et al., 1988; Halling and Smith, 1985) ．この現象は，AUG (Met)コドンの上流に，リボソーム結合部位 (AAGGAGG) に類似した配列が適度なスペーサー (通常, 5〜13ヌクレオチド) を介して存在する場合に，RNAのコード配列内で起こる可能性があります．このような短くなった産物は，完全長のタンパク質を精製しようとする際には問題となります．考えうる解決策の1つは，目的タンパク質の両端にアフィニティータグを融合するようなpETベクターを使用することです. pETベクターシリーズのいくつかは，N末端とC末端の両方にHis・Tagを融合させることができます．この場合では，完全長のタンパク質は短くなった産物よりも高濃度のイミダゾールで溶出されることになります．他のpETベクターは，(たとえばT7・Tag，S・Tag，GST・Tag，CBD・Tag，His・Tag)を用いて目的タンパク質の各末端に，それぞれ異なるタグを融合させることができます．この場合では固定化したT7・Tag抗体，S-protein (Kim and Raines, 1993, 1994) ，GST・BindまたはCB$_{IN}$Dレジンおよび His・Bindレジンを用いた連続アフィニティー精製を順次行うことによって完全長の目的タンパク質を分離することができます.

mRNAの二次構造

mRNA転写産物の二次構造によって，AUG翻訳開始コドンやリボソーム結合部位が妨害される可能性があります (Tessier et al., 1984; Looman et al., 1986; Lee et al., 1987) .

すべてのpETベクターは，下記の転写産物のどちらか一方を産生します.

rbs *Nde* I/*Nco* I

5'...AAGAAGGAGAUAUACAUAUG...3'

5'...AAGAAGGAGAUAUACCATGG...3'

少量の発現しか得られない場合は，上記配列に相補的な配列 (5'-CATATGTATATCTCCTTCTT-3' または5'-CCATGGTATATCTCCTTCTT-3') がインサートのコード鎖に存在するかどうかを調べれば，二次構造に問題があるか否かを明らかにできることがあります.

予想外の停止コドン

特にPCR産物のクローニングでは, 突然変異によって予想外の停止コドンが生成する可能性があります．このような突然変異の有無は，シークエンシングを行えば明らかににできますが，*in vitro*翻訳によっても明らかにできます．NovagenのEcoPro T7システムを使用すれば，このテストを非常に簡便に行うことができます（28ページ参照）.

転写の終結

多くの場合は，ベクター内にTφ転写ターミネーターが含まれているか否かにかかわらず同程度の量の目的タンパク質が産生されるようです．しかし，目的遺伝子の後方にTφ が存在すると，目的タンパク質の産生量が増大するケースもあります．この現象は目的遺伝子がそれ自身の翻訳開始シグナルをもつている場合に認められています (Studier et al., 1990) ．その理由としては，amp^R pETベクターで目的mRNAとともに産生される*bla* mRNAとの翻訳開始の競合が考えられます．Tφは，この競合mRNAの量を低減させるため目的タンパク質の産生量を増大します．カナマイシン耐性pETベクターの場合では，kan遺伝子と目的遺伝子が逆方向に配されているため，競合mRNAが目的mRNAとともに産生されることはありません．

目的とするmRNAおよびタンパク質の不安定性

これまで検討されてきた各ケースでは，充分量の目的mRNAが蓄積されているようですが，目的mRNAの不安定性によって発現が制限される場合もあります．BL21株は*lon*プロテアーゼおよび*ompT*プロテアーゼを欠損しており，この株で産生される多くのタンパク質はきわめて安定ですが，特定の目的タンパク質が不安定な場合もあると思われます．フレーム外（out-of-frame）融合により生じた比較的小さいタンパク質の中には，この菌株中できわめて安定なものもある一方，非常に迅速に分解されて，パルス標識でも検出できないものもあります．

VI. 目的タンパク質の確認

この項では，分析および精製のための目的タンパク質の単離法について説明します．各目的タンパク質について，その産生および局在について確認し，培地や菌体中での収量を推定するのが重要です．この確認を容易に行うには，全細胞タンパク質および4画分を，培地画分，ペリプラズム画分，可溶性細胞質画分，不溶性細胞質画分の順序で少量分析することをお勧めします．これによって，1つの画分から得られた物質を次の画分の分析に用いることができます．この分析結果に応じて，誘導条件を更に最適化する，またはこの項に記載したタンパク質抽出技術を1つまたはいくつか用いて大規模での誘導および精製が行えます．

上記4画分の分析に加えて，特に数多くのクローンをスクリーニングする場合には，PopCulture 試薬を用いて誘導培養を迅速にスクリーニング（quick screen）することが望まれます．PopCultureによる迅速なスクリーニングによって，目的タンパク質の活性を迅速に測定し，集菌することなく直接培地で発現レベルを分析することができます．

SDS-PAGEにおけるローディング容量の標準化

ゲル分析ならびにウェスタン分析を容易にするために，データの記録と標準的なミニゲルにアプライする量の計算のための2種類のワークシートをご用意しました (51ページ) ．より大きなゲルを使用する場合は，それに応じてアプライ量もスケールアップする必要があります．この式を使用するには，集菌時の正確なOD_{600}測定値と，得られた画分の濃縮係数を求める必要があります．濃縮係数は，画分を得るのに用いた元の培養液の体積を，その画分の最終体積で除した値です．

増殖および誘導

1. pET組換え体を導入したλDE3溶原菌のシード培養液を次の方法で調製する：プレートまたはグリセロールストックから滅菌ループで細胞を採取し，培養チューブ内の適切な培地 3 ml（抗生物質を含む）に植菌する．
2. OD_{600}が約0.5に達するまで，37 ° C，250 rpmで振とう培養する．OD_{600}が約0.5 に達したら，3 mlの培養液の全量を，抗生物質含む100 ml LB培地に添加する．
3. 100 mlの培養液を，適切な温度でOD_{600}が約0.5～1.0に達するまで (37 ° Cで2～3時間) 振とうする．培養中に，少量の液を無菌的に採取してOD_{600}をモニターする．
4. 誘導操作の直前に，100 mlの培養液を50 ml×2本に分割する．T7*lac*プロモーターをもつプラスミドの場合は，一方の50 ml培養液にIPTGを最終濃度1 mMとなるように添加する．“ 普通の ” T7プロモーターをもつベクターの場合は，最終濃度が0.4 mMとなるようにIPTGを加える．もう一方の培養液は非誘導コントロールとして利用する．適温で適切な時間，振とう培養する．融合タンパク質をペリプラズムに分泌させる場合，誘導時間を長くすると (16 時間以上，または一晩) ，培地へのタンパク質の漏出が促進されてしまう恐れがあるので注意されたい．

誘導培養液のOD測定

1. 誘導が終了したら，集菌直前によく振とうして均質な懸濁液とし，誘導および非誘導の培養液からそれぞれ0.5～1 mlを採取する．
2. 培養液のOD_{600}を可能な限り正確に測定する．正確な測定を行うには，OD_{600}の測定値が0.1から0.8の間となるように，培養に用いた培地でサンプリング培養液を希釈して測定に用いるようにする (通常 5倍から10倍の希釈で充分である) ．培養に使用した培地と同じものをもちいて，分光光度計のゼロ点補正を行う．
3. 希釈率とOD_{600}測定値を付属のワークシート (51ページ) に記録する．

A. 発現レベル, 活性, 可溶性分析ためのPopCultureによる迅速なスクリーニング

集菌前に，PopCultureを用いて菌体を遠心せずに，目的タンパク質の活性および発現レベルを直接迅速に測定できます．さらに，調製した抽出物を遠心して，可溶性画分と不溶性画分とを別々に分析することができます．

1. 誘導後，サンプル1mlを採取し，0.1倍量（100µl）のPopCulture試薬を添加する．
2. 元の培養液1mlあたり40U（750倍希釈1µl）のrLysozyme Solutionを添加し，菌体の溶解を促進させる．宿主株がpLysSまたはpLysEを含む場合は，rLysozymeを添加する必要はない．

   オプション：

   元の培養液1mlあたり1µl（25U）のBenzonase Nucleaseを添加し，DNAおよびRNAを分解して非粘性サンプルにする．rLysozymeおよびBenzonaseは，使用前にPopCultureと混合可能．
3. 室温で10〜15分培養．
4. 発現レベル，目的タンパク質の活性および可溶性を測定する．

   全細胞タンパク質のSDS-PAGE： 調製した抽出液の一定量を，同量の4X SDS Sample Buffer（カタログ番号70607-3）と混合し，クマシー染色またはウェスタンブロッティングにより分析する．ODが3〜5を示す発現レベルの高いタンパク質は，10µgのサンプルを用いてクマシー染色で検出することができる場合がある．発現レベルおよび細胞密度が低い場合は，ウェスタンブロッティングが必要な場合もある．

   定量分析：FRETWorks S・Tag Assay，S・Tag Rapid Assay，GST・Tag Assay等の融合タグに特異的な定量分析法は，ブラッドフォードおよびBCAタンパク質定量法と同様にのように，PopCulture抽出液と適合している．

   目的タンパク質に特異的な分析：タンパク質は一般的に，その活性と立体配座とを保持するので，タンパク質比活性分析および免疫アッセイはPopCulture抽出法と一緒に用いることができると考えられる．

   可溶性：可溶性画分と不溶性画分とを分析するために，粗抽出液を14,000×gで10分間遠心して分画する．可溶性画分：可溶性画分に相当する上清の一定量を上記したSDS-PAGEで分析するか，タンパク質活性分析および定量分析を行う．不溶性画分：ペレットを1% SDS 1 mlに入れて加熱し，激しく混合するか超音波処理によって再懸濁させる．不溶性画分に相当する可溶化したペレットの一定量は,上記したSDS-PAGEによって分析するか,S・Tag Rapid AssayまたはFRETWorks S・Tag Assayを用いて分析する（目的タンパク質がS・Tagをもつ場合）．

B. 全細胞タンパク質 (Total Cell Protein) サンプル

全細胞タンパク質 (Total Cell Protein) をSDS-PAGE後，クマシーブルー染色することにより，目的遺伝子の発現を迅速に評価できる場合があります．また，TCPサンプルは，目的タンパク質の回収率を知るためのコントロールとして，下記の種々の画分と一緒に分析する必要があります．

1. 集菌前に，充分に混和した培養液から1 ml を採取し，10,000 × gで1分間遠心する．上清をデカンテーションして除く．チューブを上下逆さまにしてペーパータオル上で軽くたたき，ペレットから余分な培地を取り去る．
2. 濃縮係数が10X (培養液の開始量1 mlに対して100 µl) となるように，ペレットを1X リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 100 µl に懸濁し，完全に混和する．
3. 4X SDS Sample Buffer (カタログ番号70607-3) 100 µlを加え，マイクロチップを使って，出力レベル2〜3，デューティ20〜30%で，8〜10バースト超音波処理する (Branson Sonifier 450; 超音波処理条件は装置ごとに異なる)．もしくは，サンプルを27ゲージの注射針に数回通し，粘性を低下させる．
4. 70 ° Cで3分間熱処理してタンパク質を変性させ，SDS-PAGEに供するまで-20 ° Cで保存する．

2X SDS Sample Buffer = 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 5% 2-ME, 150 mM DTT, 20%グリセロール, 0.01%ブロモフェノールブルー

C. 培地画分

主として誘導時間を延長した場合やタンパク質の移行が予想される場合，細胞からの目的タンパク質の分泌が疑われる場合に，培地画分の分析は有益です．ペリプラズムに移行する組換えタンパク質の多くは，解明が進んでいない分泌現象によって，最終的に培地に存在することもよくあります．多くの場合，培地中の目的タンパク質は，実際に分泌したためというより，細胞外皮の損傷によるものです（Stader and Silhavy, 1990）．

1. 培養液40 mlを，4 ° C，10,000 × gで10分間遠心して集菌する．
2. 上清サンプル1 mlを，慎重に微量遠心チューブに移す．菌体ペレットを混入させないように注意する．(残った培地は，以降のアッセイのために保存しておく．) 菌体ペレットは，次項でペリプラズム画分調製に使用するまで，氷上に置く．
3. 培地サンプルは，TCA による沈殿またはスピンフィルターによる濃縮により，下記の手順に従い濃縮する．

   トリクロロ酢酸 (TCA) による沈殿

   a) 1 mlの培地に100 µl (1/10 倍量) の100% TCA (w/v) を加え，ボルテックスを15秒かけて混合する．

   b) 氷中で15分以上置く．

   c) 14,000 × gで10分間遠心する．

   d) 上清をデカンテーションして除去する．

   e) ペレットに100 µlのアセトンを加えて混合し，5分間遠心 (14,000 × g) する．この洗浄操作2回繰り返す．ゆるいペレットからアセトンを除去する．最終的に得られたペレットを，完全に風乾させる (フタを開けたままチューブを実験台上またはドラフト内に約60分間放置するか，Speed-Vac [Savant] で軽く遠心する)．アセトンが残っていると，溶解しにくくなる．

   f) 100 µlの1X PBS (濃縮係数 = 10X) と100 µl の2X SBを加える．ボルテックスで激しく混合して，あるいは超音波処理を行って溶解する．

   g) 70℃で3分間熱処理してタンパク質を変性させ，SDS-PAGE分析に供するまで-20℃で保存する．

   スピンフィルターによる濃縮

   a) 低分子量用の分画フィルター (10 kDa以下) を用いて，メーカーの説明書に従って，500 µlの培地を約50 µlに濃縮する．これによって濃縮係数は10Xとなる．

   b) 遠心後，得られた濃縮サンプルの体積を測定して，濃縮係数をワークシートに記録する．サンプルを清浄なチューブに移す．

   c) 装置から取り出した濃縮サンプルと同量の高温 (> 90 ° C) の2X SBを用いて，スピンフィルターメンブレンを洗浄する．2X SBメンブレン洗浄液を，濃縮サンプルとあわせてプールする．

   d) 70 ° Cで3分間熱処理してタンパク質を変性させ，SDS-PAGE分析に供するまで-20 ° Cで保存　する．

注: 漏出と細胞溶解とは，細胞質の酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを測定することにより判別することができます (Battistuzzi et al., 1977)．実質的な細胞溶解が起こっていない場合，培地画分中のこの酵素の濃度は，きわめて低い値を示します．

D. ペリプラズム画分

ompT，*pelB*，CBDまたはDsbA/Cシグナル配列をもつベクターを使用した場合，目的タンパク質はペリプラズムに移行すると考えられます．ペリプラズムへの移行にはリーダー配列が必要ですが，それだけでは充分ではありません．大腸菌の細胞膜を通過する機構ついては，まだ充分に解明されていません (Wickner et al., 1991の総説があります) ．しかし，移行が目的タンパク質の成熟にも依存していることは明らかで，このドメインは運搬の主要シャペロンであるSecBによって認識されます．下記の浸透圧ショックプロトコール (Ausubel et al., 1989) は，λDE3溶原菌からペリプラズム画分を簡単に調製する方法です．しかし，pLysSまたはpLysEをもつ宿主株に用いると，T7リゾチームが内膜の崩壊を引き起こすため，それらの宿主に対しては浸透圧ショックの使用は適しません

1. 菌体ペレット(前項「培地サンプル 」のステップ2で得られたもの) を，30 mlの30 mM Tris-HCl pH 8, 20%スクロースに完全に懸濁する．次に，60 µlの0.5 M EDTA, pH 8 (最終濃度1 mM) を加える．マグネチックスターラーを用いて，室温で10分間，穏やかに撹拌する．
2. 4°C，10,000 × gで10分間遠心して集菌する．上清を，完全に除去する．
3. 氷冷した5 mM MgSO4 30 mlにペレットを完全に懸濁し, この細胞懸濁液を氷中で緩やかに10分間撹拌する. この操作の過程で，ペリプラズムのタンパク質がバッファー中に放出される．
4. 4°C，10,000 × gで10分間遠心して，浸透圧ショックを行った細胞を沈殿させる．上清 (ペリプラズム画分) 1 mlを採取して微量遠心チューブに移する．この際上清と一緒にゆるいペレットが混入しないように注意する．
5. 必要であれば，残った上清 (ペリプラズム画分) は，活性測定のために保存する．菌体ペレットは氷中に保存し，以降の可溶性画分および不溶性細胞質画分の調製に供する．
6. 前項 (培地サンプル) のステップ3の培地サンプルと同様にして，ペリプラズム画分をTCA沈殿またはスピンろ過で濃縮する．この際，濃縮係数は約10Xです．
7. 同量の4X SDS Sample Bufferを加え，70°Cで3分間熱処理してタンパク質を変性させる．SDS-PAGE分析に供するまで_20°Cで保存する．

注: この操作の成否は，光学顕微鏡で浸透圧ショック前後の菌の形態を観察比較することにより判断できます．浸透圧ショック前の菌体は杆状ですが，浸透圧ショック後は球状となっています．また，浸透圧ショックによるペリプラズムタンパク質の放出は，細胞質酵素であるグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼを測定することにより，一般的な細胞溶解と判別できます (Battistuzzi et al., 1977) ．実質的な細胞溶解が起こっていない限り，ペリプラズム画分中のこの酵素の濃度は，きわめて低い値を示します.

pET-32系ベクターで産生される*trxA*融合タンパク質の抽出には，LaVallie et al. (1993) が報告している変法を使用できます.

trxA融合タンパク質の抽出方法:

1. 誘導後の細胞を, 氷冷した20%スクロース 2.5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0に,
   5 OD_{550} units/mlの濃度となるように懸濁し，氷中に10分間置く．
2. 15,000 × gで30秒間遠心し，上清を除去した後，同量の氷冷した2.5 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0に細胞ペレットを懸濁する．氷中で10分間置く． EDTAはHis・Bind Resinには適合しないので注意する．
3. 15,000 × gで10分間遠心する．上清が浸透圧ショック画分である．上清とペレットをSDS-PAGEで分析する．

E. 可溶性細胞質画分

本項では，可溶性細胞質画分の単離方法について説明します．BugBuster Protein Extraction Regantを用いて迅速に単離することで，目的タンパク質を加熱および酸化させてしまう機械的手法を用いるよりも目的タンパク質の活性が高く保たれます．

BugBusterおよびBenzonase Nuclease処理

BugBuster Protein Extraction Regantは，大腸菌細胞壁を穏やかに破砕して，可溶性タンパク質を遊離させる非機械的手法です（Grabski et al., 1999）．本試薬は，非イオン性および両性イオン界面活性剤の混合液からなり，可溶性タンパク質を変性させることなく細胞壁に穴をあけることができます．誘導後に遠心で集菌したのち，BugBusterに再懸濁します．少量のrLysozyme Solutionを添加して溶菌効率を上昇させ，Benzonase（遺伝子工学的に作製されたエンドヌクレアーゼ）を添加して分解物の粘性を低下させることで，精製中の流速を上げることができます．短時間の培養により，タンパク質が遊離し，核酸が分解します．遠心分離での清澄化により得られた低粘性の抽出液をタンパク質分析に用い，アフィニティークロマトグラフィー用レジンで直接精製することができます．詳細については，テクニカルブリテン245（BugBuster）および261（Benzonase）を参照してください．

さまざまな用途に適したいくつかのBugBuster試薬をご用意しております．

BugBuster Reagent	特長	カタログ番号	サイズ
BugBuster Protein Extraction Reagent	トリスバッファーで濃度1Xに調製	70584-3	100ml
		70584-4	500ml
BugBuster HT Protein Extraction Reagent	トリスバッファーで濃度1Xに調製	70922-3	100ml
	したBugBusterおよびBenzonase	70922-4	500ml
	Nucleaseのプリミックス	70922-5	1L
BugBuster 10X Protein Extraction Reagent	選択したバッファーで1Xに希釈	70921-3	10ml
		70921-4	50ml
		70921-5	100ml
BugBuster（一級アミンを含まない）	PIPPSバッファーで	70923-3	100ml
Extraction Reagent	濃度1Xに調製	70923-4	500ml

1. 培地画分およびペリプラズム画分が必要ない場合には，予め重量を測定した遠心チューブに液体培地を入れ，10,000×gで10分間遠心して集菌する．上清をデカンテーションして除き，ペレットから液をできるだけ除く．得られたペレットの湿重量を測定する．この操作によって，可溶性細胞質画分およびペリプラズム画分を単離する．
2. “ペリプラズム”画分のステップ5，または上記のステップ1のペレットを室温のBugBusterに再懸濁させるため，細胞ペーストの湿重量1gあたり5mlの試薬をピペッティングするか，または弱いボルテックスにかける．一般的に，培養液50mlあたり2mlのBugBusterを用いる（サンプル濃縮係数：25）．
3. BugBuster Reagant 1mlあたり1KUのrLysozyme Solutionを添加する（5KU/g 細胞ペースト）．pLysS宿主株またはpLysE宿主株の場合には，リゾチームを添加する必要はない．

   オプション：

   a) 再懸濁に用いたBugBuster試薬1mlあたり1µl（25ユニット）のBenzonase Nucleaseを加える．rLysozymeおよびBenzonaseをPopCultureと予め混合し4°Cに保存して，調製当日に使用する．

   b) プロテアーゼインヒビターを添加する．
4. 低速にセットした振とう機または回転ミキサーで，細胞懸濁液を室温で10～20分培養する．
5. 4°C，16,000×gで20分遠心して不溶性の細片を除く．ペレットは，49ページに示した“不溶性細胞質画分”の単離に用いることができる．

6. 上清を新しいチューブに移し分析する．上清を，同量の4X SDS Sample Buffer（カタログ番号70607-3）と混合する．上清の残渣は，更なる分析や精製に用いることができる．
7. 直ちに85℃で3分間加熱してタンパク質を変性させ，SDS-PAGEに供するまで-20℃で保存する．

rLysozyme Solutionおよび凍結／融解処理

本プロトコールでは，細胞ペレットのrLysozyme（カタログ番号71110-3）処理および凍結／融解操作によって可溶性タンパク質を単離します．大腸菌株がリゾチーム（pLysS，pLysE等）をコードしたプラスミドをもつ場合は，更なるリゾチーム処理は必要ありません．

1. 培地画分およびペリプラズム画分が必要ない場合には，予め重量を測定した遠心チューブに液体培地を入れ，10,000×gで10分間遠心して集菌する．上清をデカンテーションして除き，ペレットから液をできるだけ除く．得られたペレットの湿重量を測定する．
2. ステップ1または“ペリプラズム”画分のステップ5のペレットを，-20℃または-70℃で完全に凍結する．
3. 凍結した細胞ペレットを完全に解凍して，ピペッティングするかまたは弱いボルテックスにかけて，室温の溶解バッファー（50mM Tris-HClまたはNaH_2PO_4，pH 7～8，5%グリセロール，50mM NaCl）に再懸濁する．細胞ペーストの湿重量1gあたり7mlの溶解バッファーを用いる．必要に応じてプロテアーゼインヒビターを添加する．

注： *細胞懸濁液が均一になるまではrLysozymeを加えないで下さい．凍結／融解操作によって細胞膜が破壊され，rLysozymeが細胞壁に到達してしまいます．rLysozymeの添加が早すぎると，直ちに粘性が上昇して完全に細胞を再懸濁することが難しくなり，結果として溶解が不完全になる場合があります．*

4. 溶解バッファー1mlあたり約7.5KUのrLysozymeを添加する（細胞ペースト1gあたり45～60KU）．
5. オプション：再懸濁に用いた溶解バッファー1mlあたり1μl（25ユニット）のBenzonase Nucleaseを加える．ヌクレアーゼがない系では，Benzonaseは推奨できない．核酸を剪断または沈殿させることで粘性を抑える方法もある（Burgess, 1991）．

Benzonase Nuclease（カタログ番号70664-3）は，全ての形状の核酸を分解し，粘性を取り除いて処理時間を短縮します．

6. 低速にセットした振とう機または回転ミキサーで，細胞懸濁液を室温で10～20分培養する．抽出液は培養終了時に粘性がなくなる．4℃で溶菌する場合，培養時間を長くする必要があるので，実験によって決める．
7. 4℃，16,000×gで20分遠心して不溶性の細片を除く．ペレットは，49ページに示した“不溶性細胞質画分”の単離に用いることができる．
8. 上清を新しいチューブに移して分析や精製を行う．上清を，同量の4X SDS SampleBuffer（カタログ番号70607-3）と混合し，SDS-PAGE分析に供する．
9. 直ちに85℃で3分間加熱してタンパク質を変性させ，SDS-PAGE分析に供するまで-20℃で保存する．上清の残渣は，更なる分析や精製に用いることができる．清澄した抽出液は，氷冷で短期保存（数時間）するか，必要となる時まで-20℃で冷凍する．

機械的破砕

1. a) 培地画分およびペリプラズム画分が必要ない場合には，10,000×gで10分間遠心して液体培地から集菌する．上清をデカンテーションして除き,ペレットから液をできるだけ除く．4mlの冷却した20mM Tris-HCl pH 7.5に，ペレットを濃縮係数が10X（培養液40mlに対しバッファー4ml）となるように完全に再懸濁する．必要に応じてプロテアーゼインヒビターを添加する．

   または,

   b) 上記の浸透圧ショック法のステップ4 で得られた細胞ペレットを，4 mlの冷却した 20 mM Tris-HCl pH 7.5 に，濃縮係数が10X (培養液40 mlに対しバッファー4 ml)となるように完全に懸濁する．

注: 塩を含むバッファーに細胞を溶解した場合，タンパク質のなかには，より高い溶解性性を示すものがあります．必要であれば，バッファーに最高0.5 M までNaClを添加することができます．膜結合タンパク質のようなタンパク質は，可溶化バッファーに両イオン性界面活性剤 (たとえば，10 mM CHAPS) を添加することにより，可溶性画分に分配される場合があります.

2. 下記のいずれかの方法で細胞を完全に溶解させる．
   a) *French Press.* 冷却した加圧セルを用いて，20,000 psiで2回通過させて破砕させる．
   b) *超音波処理.* 撹拌混合した後，マイクロチップを使用して出力レベル4～5，デューティ40～50%，15～20バースト，氷上で超音波処理をする．超音波処理中はサンプルを常に低温に保ってタンパク質の熱変性を防ぐことが重要である．上記の超音波処理はあくまで一般的なものであり，使用する超音波処理装置に応じてエネルギー出力を調整する．
3. 最終濃度45-60KU/g(細胞重量)となるようにrLysozyme溶液を加え，穏やかにピペッティングしてよく混ぜる．超音波をかける前に30°Cで15分間インキュベーションする．リゾチームはpLysSまたはpLysEホストを使用している場合には添加する必要がありません.
4. 抽出液の全部または抽出液1.5ml（標準SDS-PAGE分析のため）を14,000×gで10分間遠心し，可溶性画分と不溶性画分とを分離する．
5. 標準SDS-PAGE分析のために,（1.5mlのサンプルから）可溶性の上清100µlを新 しいチューブに移す．4X SDS Sample Buffer（カタログ番号70607-3）100µlおよび水を加える．直ちに85°Cで3分間加熱してタンパク質を変性させ，SDS-PAGE分析に供するまで-20°Cで保存する．
6. 必要があれば，残った上清を活性測定やタンパク質精製用に保存する．
7. 不溶性のペレット画分は，次項に記載する処理に供するため，氷冷で保存する．

F. 不溶性画分

不溶性の細胞質画分は細胞残渣と封入体といわれているアグリゲートした目的タンパク質からなります．遠心・洗浄操作を繰り返すことにより，不溶性画分（封入体）をさらに精製することが可能です．しかし，精製産物には他のタンパク質や核酸がある程度混入します．多くの場合，精製封入体は，目的タンパク質に対する抗体を作製するための抗原としてそのまま使用するのに適しています(Harlow and Lane, 1988)．不溶性画分に分配されている目的タンパク質でも，封入体に取り込まれていないことがあります．膜に会合する目的タンパク質は，溶解バッファーに界面活性剤を加えることで可溶性画分に回収されることがあります．

BugBuster処理後の封入体精製

1. 「BugBusterおよびBenzonase Nuclease処理」のステップ5で得られた不溶性ペレットを用い，BugBuster試薬に懸濁する．使用する試薬の量は，前に菌体ペレット懸濁に用いた量と同じにする．ペレットをピペッティングし，ボルテックスをかけて均一な懸濁液を得る．均一なペレットの再懸濁が不要なタンパク質を取り除き，可溶化するための高純度な調製液を作るために必須です．
2. 最終濃度200 µg/mlとなるようにリゾチームを加える（用時調製した 10 mg/mlリゾチームストック水溶液を1/50倍量使用）．ボルテックスをかけて混和し，室温で 5分間インキュベートする．
3. 脱イオン水で10倍希釈したBugBuster試薬（脱イオン水中）を懸濁液に６倍量加え，ボルテックスを1分間かける．
4. 懸濁液を4 ° C，16,000× gで15分間遠心し，封入体を集める．上清をピペットで除去する．
5. 封入体を，最初の培養液量の1/2倍量の10倍希釈したBugBusterに懸濁し，ボルテックスをかけて混和し，ステップ5と同様に遠心操作を行う．この洗浄操作をさらに2回繰り返す．
6. a) 標準SDS-PAGE分析のために，最終的に得られたペレットを1% SDS Sample Buffer 1.5mlに入れ，加熱して激しく攪拌し，必要であれば超音波処理して，再懸濁する（この量で再懸濁することで濃縮係数10Xが保持される）．100µlのサンプルを分取し，4X SDS Sample Buffer（カタログ番号70607-3）100µlと混合する．直ちに85℃で3分間加熱してタンパク質を変性させ，SDS-PAGE分析に供するまで-20℃で保存する．

   b) 精製するには，必要な精製方法に合ったバッファーをなるべく選び，変性バッファーにペレットを再懸濁する．封入体として最終的に得られたペレットは，NovagenのProtein Refording Kitで提供している1X Solubilization Buffer（テクニカルブリテン234参照）やその他の変性バッファーを用いて再懸濁できる．

機械的破砕後の封入体精製

SDS-PAGE分析用サンプルの調製

1. 不溶性のペレットを750 µlの20 mM Tris-HCl, pH 7.5に懸濁して洗浄する．10,000 × gで5分間遠心して上清を除去し，この洗浄操作を繰り返す．
2. 最終的に得られたペレットを1.5 mlの1% SDSに懸濁し，必要があれば，加熱して激しく撹拌するか，超音波処理する（再懸濁液は濃縮係数10Xを維持するようにする）．
3. 100 µlのサンプルを分取し，100 µlの2X SBに添加する．70 ° Cで3分間熱処理してタンパク質を変性させ，SDS-PAGE分析に供するまで-20 ° Cで保存する．

タンパク質精製用サンプルの調製

1. 不溶性のペレットを，変性剤を含まない適当なバッファー16ml（培養液40mlあたり）に再懸濁して洗浄し，精製用レジンとする．
2. 短時間超音波処理してペレットを完全に再懸濁し，DNAを剪断する．
3. 5,000×gで15分遠心し,他のタンパク質は可溶化したままで,封入体および細胞片を収集する．
4. 上清を除いて，変性剤を含まないバッファー20ml（培養液40mlあたり）にペレットを再懸濁する．ステップ3を繰り返す．ペレットの再懸濁に超音波処理が必要な場合もある．このステップを繰り返すことによって，トラップされたタンパク質をより多く遊離する場合もある．
5. 最終遠心分離から上清を除き，封入体を可溶化する変性剤を含むバッファー5mlにペレットを

再懸濁する．必要な精製方法になるべく合ったバッファーを使用する．最終的に得られたペレットは，NovagenのProtein Refording Kitで提供している1X Solubilization Buffer（テクニカルブリテン234参照）やその他の変性バッファーによって再懸濁できる．

6. 完全または一部が変性した封入体は，His・Tag融合タンパク質（テクニカルブリテン054）またはS・Tag融合タンパク質（テクニカルブリテン160，087）を用いて直接精製 できる．

   アフィニティー精製の前に変性タンパク質は再生できる（テクニカルブリテン234参照）．氷中でサンプルを1時間程度保冷することで，封入体が可溶化できる場合もある．

G. PopCulture Reagentを用いた抽出液の調製

PopCulture Reagentは，集菌することなく培地中の大腸菌から直接タンパク質を効率的に抽出します．この方法を用いると，細胞培養，タンパク質抽出と精製の全てを元の培養チューブ，フラスコ，多穴プレートで行うことができます（Grabski et al., 2001; Grabski et al., 2002）．

大腸菌の誘導培地は，rLysozymeの存在下，室温で10～15分PopCulture Reagentで処理します．オプションとしてBenzonase Nucleaseで更に処理することもできます．PopCulture抽出液は，FRETWorks S・Tag Assay Kit，S・Tag Rapid Assay Kit，GST・Tag Assay Kit等のタンパク質分析に直接使うことができます．調製した抽出物は，平衡化したクロマトグラフィー用レジン（GST・Mag，His・Mag等）と直接結合させ，精製に用いることもできます．His・TagまたはGST・Tag融合タンパク質の培養液1mlをハイスループット処理できる96穴培養・回収プレートが入ったRoboPop Purification KitでもPopCulture Reagentがご利用いただけます（テクニカルブリテン327参照）．

1. 0.1倍量のPopCulture Reagentを誘導培地に添加する．
2. 元の培養液1mlあたり40U（750倍希釈の1μl）のrLysozyme Solutionを添加する．宿主株がリゾチームを産生するpLysSプラスミドまたはpLysEプラスミドを含む場合は，更にrLysozymeを添加する必要はない．

   オプション：

   元の培養液1mlあたり1μl（25U）のBenzonase Nucleaseを添加する．rLysozymeおよびBenzonaseは，PopCultureと予め混合して使用でき，4℃に保存して調製当日に使用する．
3. ピペッティングにより混合し，室温で10～15分培養する．
4. このように調製した抽出物は，直接分析に供するか，平衡化したクロマトグラフィー用レジンと結合させる．

全細胞タンパク質のSDS-PAGE：調製した抽出物の一定量を同量の4X SDS Sample Buffer（カタログ番号70607-3）と混合し，クマシー染色またはウェスタンブロッティングで検出する．OD値が3～5を示す発現レベルの高いタンパク質は，サンプル10μlを用いてクマシー染色で検出できる場合がある．発現レベルおよび細胞密度が低い場合には，ウェスタンブロッティングを行う必要がある．

定量分析：FRETWorks S・Tag Assay，S・Tag Rapid Assay，GST・Tag Assayなどの融合タグに特異的な定量分析法は，ブラッドフォードまたはBCAタンパク質定量法と同様に，PopCulture抽出液に適合している．

目的タンパク質に特異的な分析：タンパク質は一般的に，その活性および立体配座を保持するので，タンパク質比活性分析および免疫アッセイはPopCulture抽出法と一緒に用いることができると考えられる．

精製：PopCultureはTrisバッファーで調製してあるため，Tris（His・Bind）バッファーおよびリン酸（GST・Bind）バッファーと同じく，中性pHでの精製システムに適用できる．His・MagまたはGST・Magアガロースビーズを使用することで，全ての手順（培養から精製まで）をカラムや遠心分離なしに一つのチューブで行うことができる．RoboPop Kitには，PopCultureと共に使用する96穴培養・精製プレート，His・TagやGST・Tag融合タンパク質の精製用レジンが入っている（テクニカルブリテン327参照）．PopCultureは，他の多くのアフィニティー精製用レジンにも使用できると考えられる．

VII. 目的タンパク質の検出と定量

タンパク質の発現は，細胞抽出液のSDS-PAGE分析の後クマシーブルーによる染色を行うことで迅速に検出することができます．目的タンパク質は非誘導抽出液の隣のレーンに流すと多くの場合単一バンドとしてあらわれます．ウェスタンブロッティングでの同定や発現レベルの評価には，より特異的で感度の高い方法で，融合タグ特定試薬，タンパク質特定抗体，その他リガンドを用いて簡便に行うことができます．活性測定はタンパク質次第ですが，特に粗抽出液では，ある程度精製を行ってから測定します．しかし，PopCulture で調製した粗抽出液は，すぐに測定可能です（43ページの「PopCulture による迅速なスクリーニング」参照）．

A. SDS-PAGEゲルへのサンプルのアプライ(補正アプライ量)

集菌時のOD_{600}に基づいてサンプルアプライ量を補正しておけば，クマシー染色したバンド強度を比較することにより，各画分の相対的な目的タンパク質の量を正確に比較することができます．Perfect Protein™ Markers (カタログ番号69149-3または69079-3) やTrail Mix Markers（カタログ番号70980-3）を使用すれば，クマシーブルー染色ゲル上で，10 kDa～225 kDaの範囲のタンパク質のサイズを正確に知ることができます．

ワークシート 1: 集菌時の培養液のOD_{600}決定

	Dilution Factor (DF)	OD_{600} of diluted sample	OD_{600} at harvest (DF x OD_{600} of diluted sample)
Induced Culture			
Uninduced Culture			

ワークシート 2: 標準的な10ウェルまたは15ウェルSDS-PAGEミニゲルへのサンプルアプライ量の決定

サンプル濃縮係数は，画分調製に用いた元の培養液を，画分の最終体積で割った値です．例えば，画分調製に1mlの培養液を用いて処理後の最終体積が100 µlならば，サンプルの濃縮係数は10となります．より大きなゲルを用いる場合は，それに応じてアプライ量もスケールアップします．得られた画分の実際の濃縮係数は変動することがあるので，各サンプルのアプライ量を計算する必要があります．

				Volume to Load	
				15-well mini-gel	10-well mini-gel
	Sample conc. factor	OD_{600} at harvest	Z (conc. Factor x OD_{600})	180 µl ÷ Z	270 µl ÷ Z
Induced Samples					
TCP					
Media					
Periplasmic					
Soluble Cytoplasmic					
Insoluble Fraction					
Uninduced Samples					
TCP					
Periplasmic					
Media					
Soluble Cytoplasmic					
Insoluble Fraction					

B. 融合タグによる検出/アッセイツール

目的タンパク質は，ウェスタンブロッティング法や，抗体，複合体またはpETベクターがコードする融合パートナーを利用した測定といった目的タンパク質に特異的な対象を用いた定量分析法によって同定，定量ができます．Novagenの検出試薬とキットを用いたウェスタンブロッティングおよび迅速な分析用の特定のプロトコールは，www.novagen.comでご覧になれますし，下記の表にも一覧を示しております．

ウェスタンブロッティングでのサイズの評価には，未知サンプルに隣接するレーンにPerfect Protein Western Blot Markers（カタログ番号69959-3）またはTrail Mix Western Markers（カタログ番号71047-3，71048-3）をアプライします．どちらのマーカーセットも，S・TagおよびHis・Tagをもっているので，S-protein Conjugate（McCormick et al., 1994）またはHis・Tag Monoclonal Antibody（Fourrier and Hayes, 2001）を用いて検出することができます．

Western Blotting	Cat. No.	Size	Technical Bulletin No./Application
CBD•Tag™ detection			
CBD_{chit}•Tag Antibody	70119-3	25 µl	Polyclonal, WB
CBD_{cysA}•Tag Antibody	70157-3	500 µl	Polyclonal, WB
CBD_{cex}•Tag Antibody	70158-3	500 µl	Polyclonal, WB
GST•Tag detection			
GST•Tag Monoclonal Antibody	71097-3	50 µg 250 µg	TB325 IF, IP, QA, WB
His•Tag® detection			
His•Tag Monoclonal Antibody	70796-4 70796-3	3 µg 100 µg	TB283 IF, IP, WB
His•Tag AP Western Reagents	70972-3	25 blots	TB283 colorimetric detection
His•Tag AP LumiBlot™ Reagents	70973-3	25 blots	TB283 chemiluminescent detection
His•Tag HRP LumiBlot Reagents	70974-3	25 blots	TB283 chemiluminescent detection
HSV•Tag® detection			
HSV•Tag Monoclonal Antibody	69171-3 69171-4	40 µg 200 µg	TB067 WB
Nus•Tag™ detection/assay			
Nus•Tag Monoclonal Antibody	71127-3 71127-4	50 µg 250 µg	TB328 WB
S•Tag detection/assay			
S-protein AP Conjugate	69598-3	50 µl	TB097 WB
S-protein HRP Conjugate	69047-3	50 µl	TB136 WB
Biotinylated S-protein	69216-3	250 µl	WB
S-protein FITC Conjugate	69060-3	200 µl	TB143 IF
S•Tag AP Western Blot Kit	69213-3	25 blots	TB082 colorimetric detection
S•Tag AP LumiBlot Kit	69099-3	25 blots	TB164 chemiluminescent detection
S•Tag HRP LumiBlot Kit	69058-3	25 blots	TB145 chemiluminescent detection
T7•Tag® detection			
T7•Tag Monoclonal Antibody	69522-3 69522-4	50 µg 250 µg	TB015 IF, IP, WB
Biotinylated T7•Tag Antibody	69968-3	125 µl	TB106 WB
T7•Tag Antibody HRP Conjugate	69048-3	100 µl	TB137 WB
T7•Tag Antibody AP Conjugate	69699-3	50 µl	TB112 WB
T7•Tag AP LumiBlot Kit	70237-3	25 blots	TB212 chemiluminescent detection
T7•Tag HRP LumiBlot Kit	70238-3	25 blots	TB213 chemiluminescent detection

IF = immunofluorescence, IP = immunoprecipitation, QA =quantitative assay, WB = Western blotting

Quantitative Assay	Cat. No.	Size	Technical Bulletin No./Sensitivity
FRETWorks™ S•Tag™ Assay Kit	70724-3 70724-4	100 assays 1000 assays	TB251; fluorescent assay, Limit < 1 fmol
S•Tag Rapid Assay Kit	69212-3	100 assays	TB082; Limit 20 fmol
GST•Tag™ Assay Kit	70532-3	100 assays	TB230; colorimetric assay, Limit 8 pmol

Western Blot Protein Markers	Cat. No	Size	Technical Bulletin No./ Size Standards
Perfect Protein™ Western Markers	69959-3	25 lanes	TB102; 15, 25, 35, 50, 75, 100 and 150 kDa
Trail Mix™ Western Markers	70982-3	25 lanes	TB310; 15, 25, 35, 50, 75, 100 and 150 kDa, and 15, 16, 100 kDa prestained markers

VIII. 目的タンパク質の精製

タンパク質の精製に用いる方法は，目的タンパク質の特性，細胞内での局在や形態，pETベクターのコンストラクト，宿主株のバックグラウンド，発現させたタンパク質の用途など，多様な要因によって異なります．培養条件も目的タンパク質の可溶性や局在性に多大な影響を及ぼします．pET Systemで発現した目的タンパク質の精製には，さまざまな方法を利用することができます．このシステムの長所の1つは，多くの場合，目的タンパク質がきわめて多量に蓄積されるので，全細胞タンパク質に占める割合が高くなることです．そのため，常法（イオン交換，ゲルろ過等）のクロマトグラフィー操作を2，3ステップ行うだけで，比較的簡単にタンパク質を単離することができます．

pETベクターで利用できる多様なペプチド融合タグが利用できるので，さまざまなアフィニティー精製法が使えます．多くの場合，アフィニティー法を用いれば，目的タンパク質をワンステップでほぼ均一の状態にまで精製できます．精製では，エンテロキナーゼ，Factor Xaまたはトロンビンといったプロテアーゼを利用して融合タグ全体または一部の切断も可能です．発現された目的タンパク質の精製や活性測定を行う前に，目的タンパク質の発現レベル，細胞内局在，溶解性について，42〜50ページの「目的タンパク質の検証」に記載した方法で予備的に分析しておく必要があります．目的タンパク質は，可溶性または不溶性の細胞質画分，ペリプラズム画分，培地画分のいずれか，またはすべてに分布している可能性があります．目的の用途にもよりますが，封入体，培地，ペリプラズムに選択的に局在している方が，比較的簡単な方法で迅速に精製することができます．

A. 精製ツール

抽出およびアフィニティークロマトグラフィー用の製品の簡単な説明を下記に示しました．詳細については，www.novagen.comでご覧いただけるテクニカルブリテンを参照してください．

Extraction Reagents	Cat. No.	Size	Technical Bulletin No./Capacity and Features
BugBuster® Protein Extraction Reagent	70584-3 70584-3	100 ml 500 ml	TB245 Use 5 ml/g wet cell paste. Tris-buffered.
BugBuster HT Protein Extraction Reagent	70922-3 70922-4	100 ml 500 ml	TB245 Use 5 ml/g wet cell paste. Tris-buffered and pre-mixed with Benzonase Nuclease.
BugBuster 10X Protein Extraction Reagent	70921-3 70921-4 70921-5	10 ml 50 ml 100 ml	TB245 Dilute to 1X with choice of buffer and use 5 ml/g wet cell paste.
BugBuster (primary amine-free) Extraction Reagent	70923-3 70923-4	100 ml 500 ml	TB245 Use 5 ml/g wet cell paste. PIPPS-buffered.
PopCulture™ Reagent	71092-3 71092-4 71092-5	15 ml 75 ml 250 ml	TB323 Use 0.1 volume per ml of culture.
rLysozyme™ Solution	71110-3 71110-4 71110-5	300 KU 1200 KU 6000 KU	TB334 and TB323 Use 40 U per 1 ml of culture volume with PopCulture Reagent and 1 KU per 1 ml BugBuster Reagent.
Benzonase® Nuclease, Purity > 90%	70746-3 70746-4	10,000 U 2,500 U	TB245, 323, 261 Use 25 U per ml original culture volume with PopCulture and BugBuster Reagent
CBD•Tag™ purification	**Cat. No.**	**Size**	**Technical Bulletin No./Capacity and Features**
CBD Tag™ 100 Resin	70120-3	25 g	TB189 Capacity is 40 mg/g resin
CBD 200 Resin	70121-3	25 g	TB189 Capacity is 5 mg/g resin
CBD 300 Cartridges	70124-3 70124-4	pkg/10 pkg/50	TB189 Pre-packed, Capacity is 1.5 mg/cartridge
CBD 900 Cartridges	70132-3 70132-4	pkg/10 pkg/50	TB189 Pre-packed, Capacity is 4.5 mg/cartridge
CBD ReadyRun Columns	70144-3 70144-4	pkg/12 pkg/60	TB189 Pre-packed, Capacity is 10 mg per column.
GST•Tag™ purification	**Cat. No.**	**Size**	**Technical Bulletin No./Capacity and Features**
GST•Bind™ Resin	70541-3 70541-4	10 ml 50 ml	TB235 Capacity is 5–8 mg/ml settled resin
GST•Bind Buffer Kit	70534-3		TB235 All buffers for ten 2.5 ml columns
GST•Mag™ Agarose Beads	71084-3 71084-4	2 × 1 ml 10 × 1 ml	TB235 Magnetic agarose beads. Capacity up to 2 mg/ml settled volume
BugBuster GST•Bind Purification Kit	70794-3		TB235 GST•Bind Resin and Buffer, BugBuster, Benzonase and Chromatography Columns.
PopCulture GST•Mag Purification Kit	71113-3		TB235 Process 40 × 3 ml cultures purifying up to 150 µg per 3 ml culture.
RoboPop™ GST•Mag Purification Kit	71102-3		TB327 Purify up to 4.8 mg per 96 wells
His•Tag® purification	**Cat. No.**	**Size**	**Technical Bulletin No./Capacity and Features**
Ni-NTA His•Bind® Resin	70666-3 70666-4 70666-5	10 ml 25 ml 100 ml	TB273 Capacity is 5–10 mg/ml settled resin
Ni-NTA Superflow	70691-3 70691-4 70691-5	10 ml 25 ml 100 ml	TB273 Capacity is 5–10 mg/ml settled resin, high flow rates and pressures
Ni-NTA Buffer Kit	70839-3		TB273 All buffers for native purification using Ni-NTA His•Bind and Ni-NTA Superflow resins.

His•Bind® Resin	69670-3 69670-4 69670-5	10ml 50 ml 100ml	TB054 Capacity is 8 mg/ml settled resin
His•Bind Buffer Kit	69755-3		TB054 All buffers for native purification using His•Bind Resin
His•Bind Columns	70971-3 70971-4	pkg/5 pkg/25	TB054 pre-packed, pre-charged; Capacity is 10 mg per column.
His•Bind Quick Columns	70159-3 70159-4	pkg/12 pkg/60	TB054 pre-packed, pre-charged, requires vacuum, Capacity is 5 mg per column.
His•Bind Quick 300 Cartridges	70155-3 70155-4	pkg/10 pkg/50	TB054 pre-packed, pre-charged, Capacity is 0.5 mg per cartridge
His•Bind Quick 900 Cartridges	70153-3 70153-4	pkg/10 pkg/50	TB054 pre-packed, pre-charged, Capacity is 2 mg per cartridge
His•Mag Agarose Beads	71002-3 71002-4	2 ml 10 ml	TB054 magnetic agarose beads, pre-charged, Capacity is 5 mg per ml settled beads.
His•Bind Quick Buffer Kit	70665-3		TB054 all buffers for native purification using His•Bind Columns, Quick Columns, Cartridges and His•Mag Agarose Beads. No charge buffer included.
His•Bind Purification Kit	70239-3		TB054 10 ml His•Bind Resin, Buffers and Chromatography Columns
BugBuster® Ni-NTA His•Bind Purification Kit	70751-3		TB273 10 ml Ni-NTA His•Bind Resin, BugBuster, Benzonase and Chromatography Columns.
BugBuster His•Bind Purification Kit	70793-3		TB054 10 ml His•Bind Resin and Buffer, BugBuster, Benzonase and Chromatography Columns.
PopCulture™ His•Mag™ Purification Kit	71114-3		TB054 Process 40 × 3 ml cultures purifying up to 375 µg per 3 ml culture.
RoboPop™ His•Mag Purification Kit	71103-3		TB327 Purify up to 12 mg per 96 wells

S•Tag™ purification	**Cat. No.**	**Size**	**Technical Bulletin No./Capacity and Features**
S-protein Agarose	69704-3 69704-4	2 ml 5 × 2 ml	TB087, TB160 Purify up to 1 mg per 2 ml settled resin
S•Tag Thrombin Purification Kit	69232-3		TB087 Purify and cleave up to 1 mg target protein per kit (2 ml settled resin)
S•Tag rEK Purification Kit	69065-3		TB160 Purify and cleave up to 1 mg target protein per kit (2 ml settled resin)

T7•Tag® purification	**Cat. No.**	**Size**	**Technical Bulletin No./Capacity and Features**
T•Tag Antibody Agarose	69026-3	2 × 1 ml	TB125 minimum 300 µg T7•Tag -galactosidase per ml settled resin. May vary between target proteins.
T•Tag Affinity Purification Kit	69025-3		TB125 minimum 300 µg T7•Tag -galactosidase per ml settled resin. May vary between target proteins. One ml of agarose, buffers and columns for purification.

Proteases and Cleavage Capture Kits	**Cat. No.**	**Size**	**Technical Bulletin No./Description**
Thrombin, Restriction Grade	69671-3	50 U	TB188
Biotinylated Thrombin	69672-3	50 U	TB188
Thrombin Cleavage Capture Kit	69022-3		TB188 50 U Biotinylated Thrombin and Streptavidin Agarose for Biotinylated Thrombin removal
Recombinant Enterokinase	69066-3	50 U	TB150
Enterokinase Cleavage Capture Kit	69067-3		TB150 50 U Recombinant Enterokinase and EKapture™ Agarose for enterokinase removal
Factor Xa, Restriction Grade	69036-3	400 U	TB205
Factor Xa Cleavage Kit	69037-3		TB205 400 U Factor Xa and Xarrest™ Agarose for Factor Xa removal

B. 封入体の可溶化およびタンパク質の再生

不溶性のタンパク質の再生(refolding)については，これまでにさまざまな方法が報告されています (Burgess, 1996; Frankel and Leinwand, 1996; Mukhopadhyay, 1997; Kurucz et al., 1995; Rudolph and Lilie, 1996; Marston and Hartley, 1990) ．ほとんどのプロトコールは，次のような方法を用いています．遠心操作により不溶性の封入体を単離したのち，変性条件下で可溶化し，次いでタンパク質を非変性バッファーで透析または希釈して，タンパク質にはそれぞれ特有の再生特性があるため，目的タンパク質ごとに最適な再生プロトコールを実験的に決める必要があります．最適な再生条件は，タンパク質濃度，還元剤，酸化還元処理，二価カチオンなどの変動因子を少スケール実験で検討する(マトリックス法)ことによって迅速に決定することができます．最適濃度がわかったら，大スケールでの目的タンパク質の可溶化と再生を行うことができます．

NovagenのProtein Refolding Kitでは，N-ラウリルサルコシンを含むアルカリpHのCAPSバッファーで封入体を可溶化したのち，DTT存在下で透析して再生を促します．タンパク質の可溶化および再生に関するさまざまな方法や因子については，www.novagen.comからダウンロードできるTB234に解説されています．

目的タンパク質，発現条件，および目的用途によっては，洗浄後の封入体から90%以上の純度で可溶化タンパク質が得られていて，さらに精製する必要がない場合があります．His・Tag融合タンパク質とHis・Bind金属キレート化クロマトグラフィー (TB054参照) を使用すれば，完全な変性条件下 (再生前) での精製が可能です．また，6 M 尿素を用いて封入体から可溶化したS・Tag融合タンパク質は，S-protein Agaroseクロマトグラフィーを行う前に尿素濃度を2 M に希釈しておけば，この部分変性条件下で精製することができます (TB160またはTB087参照)．再生した融合タンパク質は，His・TagやS・Tagを行う適当なアフィニティータグ (GST・Tag，CBD・Tag，T7・Tagなど) を利用して，非変性条件下でアフィニティー精製することができます．

IX. 誘導コントロール: β-ガラクトシダーゼ組換え体

すべてのpETベクターおよびシステムには誘導コントロールが含まれています．多くの場合，この誘導コントロールは大腸菌β-ガラクトシダーゼ遺伝子がインサートとして挿入された適切なpETベクターを含む菌株グリセロールストックです．これらの組換え体を使用することで，菌の発現能や，非変性および変性条件下でのアフィニティー精製能を確認することが可能です．プラスミドの構造の詳細については，19ページのコントロール株を参照してください．

これらの菌株は，誘導条件検討用のコントロールとして利用できるだけでなく，適切な酵素によるN末端融合配列のプロテアーゼ分解の試験にも使用することができます．これらの菌株は目的遺伝子として大腸菌β-ガラクトシダーゼを発現するので，この酵素活性を指揮して，精製および分解ステップを通してタンパク質を容易に追跡することができます．標準的な誘導条件下では，多量の116 kDa β-ガラクトシダーゼタンパク質は可溶性画分に蓄積するため，適切なアフィニティーレジンを用いて非変性条件下で精製を行った場合，その酵素活性は保持されます．この酵素は，尿素またはグアニジンを用いた変性条件下でも精製することができますが，活性測定を行う前には再生する必要があります．多くの宿主株は天然のβ-ガラクトシダーゼを産生しますが，ほとんどの場合，その量はpET 組換え体から発現誘導される組換え酵素の量に比べればごくわずかです．

精製したβ-ガラクトシダーゼ融合タンパク質を適切な部位特異的プロテアーゼで処理すると，大きな分解産物 (116 kDaのβ-gal 酵素) と小さな分解産物 (融合タグ) が生じます．融合タグの中には小さすぎるものもあるため，必ずしも分解の成否をゲル分析で確認できるとは限りません．このような場合，分解したタンパク質サンプルを適切なアフィニティーレジンにバッチ法で結合させるという別の分析方法を用いることができます．この方法ではレジンを遠心除去し，その上清をSDS-PAGEで分析します．切断が完全に行われていれば，すべての目的タンパク質は上清に認められるはずです．この方法を改変すれば，酵素（またはあらゆる測定可能な目的タンパク質）の分解を追跡することも可能と思われます．

機能的なβ-ガラクトシダーゼは4量体タンパク質であり，活性発現には4量体の形成が必須であることにご注意ください．切断されたペプチド鎖も未切断のペプチド鎖も会合して機能的な分子を形成することができます．そのため，酵素活性によって測定された未結合のタンパク質の量は，実際の切断の程度を過少に示すこととなります．したがって，活性測定法では，切断が完了するまでは半定量的にしかプロテアーゼ分解を評価することができません．

β-ガラクトシダーゼ測定法

BetaRedβ-Galactosidase Assay Kit（カタログ番号70978-3）により，細胞抽出液中のβ-ガラクトシダーゼを迅速かつ高感度に測定することができます．rLysozume SolutionおよびBenzonase Nucleaseだけでなく，BugBuster Reagent，PopCulture Reagent，標準PBSおよびTrisの溶解バッファーで調製した抽出液もこの測定法に用いることができます．比色定量BetaRed Assayは，ONPGベースの測定法よりも10倍感度が高く（1pg）なります．プロトコールの詳細については，テクニカルブリテン303を参照してください．

X. Acknowledgments

Novagen gratefully acknowledges Bill Studier, Alan Rosenberg, and John Dunn of Brookhaven National Laboratories for many helpful discussions and for their permission to print portions of the sections *About the System* and *Optimizing Expression*.

XI. References

Aslanidis, C. and de Jong, P.J. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**, 6069–6074.

Aslund, F., Bessette, P.H., Georgiou, G. and Beckwith, J. (1999) *in**Nova**tions* **10**, 11–12.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K (1989) *in* Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, New York.

Bessette, P.H., Aslund, F., Beckwith, J. and Georgiou, G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 13703–13708.

Brennan, W.A. and Lin, S.H. (1996) *in* " Strategies for Protein Purification and Characterization, A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Brinkmann, U., Mattes, R.E. and Buckel, P. (1989) *Gene* **85**, 109–114.

Burgess, R.R. (1991) *Meth. Enzymol.* **208**, 3–10.

Burgess, R.R. (1996) *Meth. Enzymol.* **273**, 145–149.

Buttistuzzi, G., Esan, G.J.F., Fasuan, F.A., Modiano, G. and Luzzatto, L. (1977) *Am. J. Hum. Genet.* **29**, 31–36.

Calderone, T.L., Stevens, R.D. and Oas, T.G. (1996) *J. Mol. Biol.* **262**, 407–412.

Chang, A.C.Y. and Cohen, S.N. (1978) *J. Bacteriol.* **134**, 1141.

Chang, J.Y. (1985) *Eur. J. Biochem.* **151**, 217–224.

Chen, G.F. and Inouye, M. (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**, 1465–1473.

Collins-Racie, L.A., McColgan, J.M., Grant, K.L., DiBlasio-Smith, E.A., McCoy, J.M. and LaVallie, E.R. (1995) *Biotechnology (N Y)* **13**, 982–987.

Davis, G.D., Elisee, C., Newham, D.M. and Harrison, R.G. (1999) *Biotechnol. Bioeng.* **65**, 382–388.

Del Tito, B.J., Jr., Ward, J.M., Hodgson, J., Gershater, C.J., Edwards, H., Wysocki, L.A., Watson, F.A., Sathe, G. and Kane, J.F. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 7086–7091.

Doherty, A.J., Ashford, S.R., Brannigan, J.A., and Wigley, D. B. (1995) *Nucl. Acids Res.* **23**, 2074–2075.

Dubendorff, J.W. and Studier, F.W. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 45–59.

Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1983) *J. Mol. Biol.* **166**, 477–535.

Eron, L. and Block, R. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 1828–1832.

Fourrier, K. and Hayes, S. (2001) *in**Nova**tions* **12**, 8–9.

Frankel, S.A. and Leinwand, L.A. (1996) *U.S. patent no. 5,240,834*.

Fried, M.G. and Crothers, D.M. (1984) *J. Mol. Biol.* **172**, 241–262.

Grabski, A., Drott, D., Handley, M., Mehler, M. and Novy, R. (2001) *in**Nova**tions* **13**, 1–4.

Grabski, A., McCormick, M. and Mierendorf, R. (1999) *in**Nova**tions* **10**, 17–19.

Grabski, A., Mehler, M., Drott, D. and Van Dinther, J. (2002) *in**Nova**tions* **14**, 2–5.

Grodberg, J. and Dunn, J.J. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 1245–1253.

Grossman, T.H., Kawasaki, E.S., Punreddy, S.R. and Osburne, M.S. (1998) *Gene* **209**, 95–103.

Halling, S.M. and Smith, S. (1985) *Bio/Technology* **3**, 715–720.

Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Harrison, R.G. (2000) *in**Nova**tions* **11**, 4–7.

Haun, R.S., Serventi, I.M. and Moss, J. (1992) *Biotechniques* **13**, 515–518.

Hirel, P.H., Schmitter, M.J., Dessen, P., Fayat, G. and Blanquet, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U . S. A.* **86**, 8247–8251.

Hua, Z., Wang, H., Chen, D., Chen, Y. and Zhu, D. (1994) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **32**, 537–543.

Huang, J., Villemain, J., Padilla, R. and Sousa, R. (1999) *J. Mol. Biol.* **293**, 457–475.

Inouye, M., Arnheim, N. and Sternglanz, R. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7247.

Joly, J.C. and Swartz, J.R. (1997) *Biochemistry* **36**, 10067–10072.

Kajava, A.V., Zolov, S.N., Kalinin, A.E. and Nesmeyanova, M.A. (2000) *J. Bacteriol.* **182**, 2163–2169.

Kane, J.F. (1995) *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 494–500.

Kelley, K.C., Huestis, K.J., Austen D.A., Sanderson, C.T., Donoghue, M.A. Stickel, S. K, Kawasaki, E.S., and Osburne M.S. (1995) *Gene* **156**, 33–36.

Kurland, C. and Gallant, J. (1996) *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**, 489–493.

Kuruez, I., Titus, J.A., Jost, C.R. and Segal, D.M. (1995) *Mol. Immunol.* **32**, 1443–1452.

Lathrop, B.K., Burack, W.R., Biltonen, R.L. and Rule, G.S. (1992) *Protein Expr. Purif.* **3**, 512–517.

LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J.M. (1993) *Bio/Technology* **11**, 187–193.

Le Bonniec, B.F., MacGillivray, R.T. and Esmon, C. T. (1991) *J. Bio. Chem.* **266**, 13,706–13,803.

Le Bonniec, B.F., Myles, T., Johnson, T., Knight, C.G. Tapparello, C. and Stone S. R. (1996) *Biochem.* **35**, 7114–7122.

Leahy, D.J.H., W.A., Aukhil, I. and Erickson, H.P. (1992) *Science* **258**, 987–991.

Lee, N., Zhang, S.Q., Cozzitorto, J., Yang, J.S. and Testa, D. (1987) *Gene* **58**, 77–86.

Looman, A.C., Bodlaender, J., de Gruyter, M., Vogelaar, A. and van Knippenberg, P.H. (1986) *Nucl. Acids Res.* **14**, 5481–5497.

Marston, F.A. and Hartley, D.L. (1990) *Meth. Enzymol.* **182**, 264–276.

McAllister, W.T., Morris, C., Rosenberg, A.H. and Studier, F.W. (1981) *J. Mol. Biol.* **153**, 527.

McCormick, M., Yaeger, K., Novy, R. and Van Oosbree, T. (1994) *in**Nova**tions* **2**, 7.

McCormick, M.R. and Ambuel, Y. (2000) *In**Nova**tions* **11**, 8–11.

Mierendorf, R., Yaeger, K. and Novy, R. (1994) *in**Nova**tions* **1**, 1–3.

Missiakas, D., Georgopoulos, C. and Raina, S. (1994) *EMBO J.* **13**, 2013–2020.

Moffatt, B.A. and Studier, F.W. (1987) *Cell* **49**, 221.

Mukhopadhyay, A. (1997) *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **56**, 61–109.

Novy, R., Berg, J., Yaeger, K. and Mierendorf, R. (1995) *in**Nova**tions* **3**, 7–9.

Novy, R., Drott, D., Yaeger, K. and Mierendorf, R. (2001) *in**Nova**tions* **12**, 1–3.

Novy, R. and Morris, B. (2001) *in**Nova**tions* **13**, 8–10.

Novy, R., Yaeger, K. and Miller, S.A. (1997) *in**Nova**tions* **7**, 4–7.

Pan, S. and Malcom, B.A. (2000) *Biotechniques* **29**, 1234–1238.

Preibisch, G., Ishihara, H., Tripier, D. and Leineweber, M. (1988) *Gene* **72**, 179–186.

Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A. and Beckwith, J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 15661–15667.

Raina, S. and Missiakas, D. (1997) *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 179–202.

Rietsch, A., Belin, D., Martin, N. and Beckwith, J. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 13048–13053.

Ritz, D., Lim, J., Reynolds, C.M., Poole, L.B. and Beckwith, J. (2001) *Science* **294**, 158–160.

Rosenberg, A.H., Goldman, E., Dunn, J.J., Studier, F.W. and Zubay, G. (1993) *J. Bacteriol.* **175**, 716–722.

Rosenberg, A.H., Lade, B.N., Chui, D.S., Lin, S.W., Dunn, J.J. and Studier, F.W. (1987) *Gene* **56**, 125–135.

Rudolph, R. and Lilie, H. (1996) *FASEB J.* **10**, 49–56.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schein, C.H. and Noteborn, M.H.M. (1989) *Bio/Technology* **7**, 1141–1148.

Schenborn, E.T. and Mierendorf, R. (1985) *Nucleic Acids Res* **13**, 6223-6236.

Schenk, P.M., Baumann, S., Mattes, R. and Steinbiss, H.H. (1995) *Biotechniques* **19**, 196–200.

Seidel, H.M., Pompliano, D.L. and Knowles, J.R. (1992) *Biochemistry* **31**, 2598–2608.

Sektas, M. and Szybalski, W. (2002) *in**Nova**tions* **14**, 6–8.

Snyder, W.B. and Silhavy, T.J. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 953–963.

Sone, M., Akiyama, Y. and Ito, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 10349–10352.

Sorensen, M.A., Kurland, C.G. and Pedersen, S. (1989) *J. Mol. Biol.* **207**, 365–377.

Stader, J.A. and Silhavy, T.J. (1990) *Meth. Enzymol.* **185**, 166–187.

Stewart, E.J., Aslund, F. and Beckwith, J. (1998) *EMBO J.* **17**.

Studier, F.W. (1991) *J. Mol. Biol.* **219**, 37–44.

Studier, F.W. and Moffatt, B.A. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) *Meth. Enzymol.* **185**, 60–89.

Tessier, L.H., Sondermeyer, P., Faure, T., Dreyer, D., Benavente, A., Villeval, D., Courtney, M. and Lecocq, J.P. (1984) *Nucleic Acids Res.* **12**, 7663–7675.

Tobias, J.W., Shrader, T.E., Rocap, G. and Varshavsky, A. (1991) *Science* **254**, 1374–1377.

Wickner, W., Driessen, A.J.M. and Hartl, F.-U. (1991) *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 101–124.

Wood, W. (1966) *J. Mol. Biol.* **16**, 118–133.

Zahn, K. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 2926–2933.

Zapun, A., Missiakas, D., Raina, S. and Creighton, T.E. (1995) *Biochemistry* **34**, 5075–5089.

Zhang, S.P., Zubay, G. and Goldman, E. (1991) *Gene* **105**, 61–72.

Zhang, X. and Studier, F.W. (1997) *J. Mol. Biol.* **269**, 10–27.

XII. Index

β-galactosidase assay, 57

Academic/Non-profit Assurance Letter, 64
Acknowledgments, 58
AD494, 16, 22, 36, 64
affinity purification, 40
agarose gel, 23, 24
alkaline phosphatase, 23, 24
amino terminus, 40
ampicillin, 18, 19, 22, 37
ampicillin resistance, 18
antibiotic resistance, 18
assay products (table), 52

B strains, 14, 16, 36
B834, 14, 15, 16, 64, 65, 67
bacteriophage CE6, 4, 13, 18, 20, 64, 67, 68
basal expression, 4, 11, 12, 39, 65
Benzonase® Nuclease, 43, 46, 50, 54, 55
BetaRed™ β-Gal Assay, 57
BL21, 14, 15, 16, 19, 22, 25, 36, 64
BL21*trxB*, 16, 22
BLR, 14, 16, 19, 64
BugBuster™ Protein Extraction Reagent, 12, 34, 43, 46, 49, 54

cAMP, 11, 12, 38
CAPS, 56
carbenicillin, 18, 19, 22, 37, 39
CBD•Tag™, 6, 28, 40, 52, 56
CBD$_{cbs}$•Tag, 7, 19
CE6, 4, 13, 18, 20, 64, 67, 68
chloramphenicol, 11, 17, 19, 22
Clonables™, 25
cloning hosts, 13
codon usage, rare, 15, 36
ColiRollers™, 27
colony PCR, 31, 32
copy number, 13, 37
coupled transcription/translation, 28
cytoplasmic fraction, 46

DE3 lysogen, 14
dephosphorylate, 23
detection products (table), 52
detergent, 11, 34
difficult target proteins, 40
disulfide bond formation, 16, 17, 35, 36
disulfide bond isomerization, 35
DNA Ligation Kit, 25
DNA purification, 32
DsbA, 19, 35, 45
DsbC, 35

EcoPro™, 28, 29
endA, 13, 16, 17, 66
expression hosts, 14, 65

f1 origin, 8, 13, 32
fMet, 40
French Press, 48
FRETWorks™ S•Tag Assay, 6, 50, 51, 53
fusion tags, 6, 9, 53, 57
Fusion tags (table), 18
fusion tags, detection, 52

galactosidase, 19, 43, 50, 57
genotypes, 16
glucose, 12, 38, 39
glucose-6-phosphate dehydrogenase, 44
glycerol stocks, 4, 16, 22, 65
gor, 6, 7, 15, 16, 17, 35, 36
GST•Tag™, 7, 8, 10, 19, 35, 40, 53, 56

helper phage, 13, 14, 32
His•Tag®, 7, 8, 15, 19, 40, 52
HMS174, 11, 16, 64, 65, 67, 68
host strain catalog numbers (table), 68
host strain genotypes, 16
host strain, selecting, 14
host strain, storage, 22
hosts for cloning, 13
HSV•Tag®, 19, 52

in vitro transcription/translation, 28
inclusion bodies, 6, 33, 34, 56
inclusion bodies, purification, 49
induction control, 19, 57
induction control (table), 19
induction of DE3 lysogens, 33
induction, low temperature, 34
induction, toxic gene, 39
insoluble fraction, 34, 48
IPTG, 14, 22, 33

K12 strains, 13, 16
kanamycin, 15, 18, 19, 22, 37, 41
KOD HiFi DNA Polymerase, 30
KOD Hot Start DNA Polymerase, 30
KOD XL DNA Polymerase, 30

lacI, 14, 16, 17
lacI^q, 36
lactamase, 18, 37
lacUV5, 12, 14

LIC, 23
ligation, 24, 25, 29
ligation PCR, 30
ligation-independent cloning, 5, 8, 9, 10, 23
lon protease, 14
LumiBlot™, 52
Lysogenization Kit, 14, 68

M13KO7, 32
medium fraction, 44
methionine auxotrophs, 15
methionyl aminopeptidase, 40
Mobius™, 29, 32
mutations, 41
mutations, minimizing, 24

Nco I, 9, 40
N-end rule, 40
N-lauroylsarcosine, 56
Non-Distribution Agreement, 64
Normalized SDS-PAGE, 51
NovaBlue, 13, 16, 17, 25, 64
Nova*Taq*™, 30, 31
NovaTope®, 16, 66
Nus•Tag™, 7, 8, 10, 19

ompT, 14, 16, 17, 45
optical density analysis, 42, 51
optimizing expression, 40
Origami™, 15, 17, 36, 64, 66
Origami™ B, 14, 15, 16, 33, 36, 64, 66
osmotic shock, 45
outer membrane protease, 14

pACYC184, 11
pBR322, 37
PCR, 24, 29, 30, 31, 32
pelB, 45
Pellet Paint® Co-Precipitant, 24, 29, 30
Pellet Paint® NF Co-Precipitant, 29, 30
Perfect Protein™ Markers, 51
Perfect Protein™ Western Markers, 52
periplasm, 35, 45
periplasmic fraction, 45
pET host strain characteristics (table), 16
pETBlue™, 13
pETcoco™, 13, 37
pEX*lox*®, 29, 32
PKA, 19
pLacI, 13
plasmid purification, 32
plasmid stability test, 38
pLysE, 11, 12, 33, 45, 64, 68
pLysS, 11, 12, 15, 16, 19, 33, 45, 64, 68
PopCulture™, 12, 34, 42, 43, 50, 54
primers, 29, 32
protease cleavage, 10, 57
proteolytic degradation, 6, 40
pSCREEN, 18, 29
*Psh*A I, 10
pTriEx™, 13
purification under fully denaturing conditions, 56
purification under native conditions, 56
purification under partially denaturing conditions, 56
purification, insoluble cytoplsmic fraction, 49
purification, medium fraction, 44
purification, periplasmic fraction, 45
purification, soluble cytoplasmic fraction, 46

quick screen, PopCulture, 43

R408, 32
reading frame, 7
recA⁻, 13, 14, 25
Refolding Kit, 56
resin, CBIND™, 40
resin, GST•Bind™, 40
resin, His•Bind®, 40, 45, 55
restriction enzyme, 23
retention of plasmid, 37
ribosome binding site, 40, 41
rifampicin, 22
rLysozyme™ Solution, 43, 46, 47, 48, 50, 54, 57
RNase, 32
RosettaBlue™, 15, 17, 36, 64
Rosetta-gami™, 15, 17, 36, 64
Rosetta™, 15, 17, 36, 64

S•Tag™, 19, 40, 51, 52, 53, 56
*Sam7*mutation, 18
SDS-PAGE. analysis, 51
selenomethionyl labeling, 15
signal sequence, 12, 45
single stranded plasmid DNA, 13
Singles™, 25, 26
Sma I, 10
solubility, 6, 7, 15, 33, 34, 35, 36, 43, 48, 53
solubilization, 56
soluble cytoplasmic fraction, 46
sonication, 48
spin filter concentration, 44
SpinPrep™, 32
S-protein, 40, 52, 56
star activity, 23
stock solutions (table), 22
stop codons, 41
strain derivation, 16

T7 lysozyme, 11, 45
T7 promoter, 29, 33

T7 promoter primer, 32
T7 RNA polymerase, 29, 64
T7 terminator, 18
T7 terminator primer, 32
T7•Tag®, 19, 40, 52, 56
T7•Tag® antibody, 40
T7*lac* promoter, 11, 12, 33
target protein, detection, 51
target protein, purification, 53
target protein, quantifying, 51
target protein, affinity purification, 53
TCA precipitation, 44
TCP, 43
Test Plasmid, 26
tetracycline, 19, 22
total cell protein, 43
toxic genes, 18, 37, 38
toxic genes and plasmid instability, 37
toxic genes, induction of, 39
Trail Mix™ Markers, 51
Trail Mix™ Western Markers, 52
transcription terminator, 41
transcription vectors, 5
transcription/translation, 28, 29
transformation, 25, 26
transformation of expression host, 33
translation vectors, 5
truncated expression products, 40
Trx•Tag™, 7, 19
trxA fusion protein extraction, 45
trxB, 16, 22, 36, 64
Tuner™, 17, 64

UltraMobius™, 32

Western blotting, 51, 52

zwitterionic detergent, 34, 48

XIII. Academic and Non-profit Laboratory Assurance Letter

The T7 expression system is based on technology developed at Brookhaven National Laboratory under contract with the U.S. Department of Energy and is the subject of patent applications assigned to Brookhaven Science Associates (BSA). This technology, including bacteria, phages and plasmids that carry the gene for T7 RNA polymerase, is made available on the following conditions:

1. The T7 expression system is to be used for noncommercial research purposes only. A license is required for any commercial use, including use of the T7 system for research purposes or for production purposes by any commercial entity. Information about commercial licenses may be obtained from the Patent Office, Brookhaven National Laboratory, Upton, New York, 11973, Telephone: (631) 344-7134. Contact: Christine Brakel.
2. No materials that contain the cloned gene for T7 RNA polymerase may be distributed further to third parties outside of your laboratory, unless the recipient receives a copy of this assurance letter and agrees to be bound by its terms. This limitation applies to any of the following materials that are included in this kit and to any derivatives you may make of them:

E. coli AD494(DE3)	*E. coli* Origami(DE3)pLacI
E. coli AD494(DE3)pLysS	*E. coli* Origami B-(DE3)
E. coli B834(DE3)	*E. coli* Origami B(DE3)pLysS
E. coli B834(DE3)pLysS	*E. coli* Origami B(DE3)pLacI
E. coli BL21(DE3)	*E. coli* Rosetta(DE3)
E. coli BL21(DE3)pLysS	*E. coli* Rosetta(DE3)pLysS
E. coli BL21(DE3)pLysE	*E. coli* Rosetta(DE3)pLacI
E. coli BL26(DE3)pLysE	*E. coli* Rosetta-gami(DE3)
E. coli BL21*trxB*(DE3)	*E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLysS
E. coli BL21*trxB*(DE3)pLysS	*E. coli* Rosetta-gami(DE3)pLacI
E. coli BLR(DE3)	*E. coli* RosettaBlue(DE3)
E. coli BLR(DE3)pLysS	*E. coli* RosettaBlue(DE3)pLysS
E. coli HMS174(DE3)	*E. coli* RosettaBlue(DE3)pLacI
E. coli HMS174(DE3)pLysS	*E. coli* Tuner(DE3)
E. coli HMS174(DE3)pLysE	*E. coli* Tuner(DE3)pLysS
E. coli NovaBlue(DE3)	*E. coli* Tuner(DE3)pLacI
E. coli Origami(DE3)	Bacteriophage λCE6
E. coli Origami(DE3)pLysS	Bacteriophage λCE6

3. The initial purchaser may refuse to accept the above conditions by returning the kit unopened and the enclosed materials unused. By accepting or using the kit or the enclosed materials, you agree to be bound by the foregoing conditions.

XIV. Bacterial Strain Non-Distribution Agreement

By purchase of the AD494, BL21*trxB*, Origami, Origami B, Rosetta, RosettaBlue or Rosetta-gami host strains and acceptance of the following terms, Novagen grants a limited license to use the AD494, BL21*trxB*, Origami, or Origami B, Rosetta, RosettaBlue, and Rosetta-gami host strains for the cloning and expression of genes. The intent of this license is not to limit the research use of these materials, but to protect against unauthorized commercial distribution of the strains by third parties.

1. The AD494, BL21*trxB*, Origami, Origami B, Rosetta, RosettaBlue, Rosetta-gami host strains or any derivative therefrom is not to be offered for resale or distributed outside your laboratory.
2. Gene clones and libraries in the AD494, BL21*trxB*, Origami, Origami B, Rosetta, RosettaBlue, and Rosetta-gami host strains may be distributed for research purposes only, provided that the recipient acknowledge the foregoing condition.

The initial purchaser may refuse to accept the above conditions by returning the kit unopened and the enclosed materials unused. By accepting or using the kit or the enclosed materials, you agree to be bound by the foregoing conditions.

XV. Appendix: pET System Host Strains and Lambda Phages

DE3 Lysogens for Protein Expression

The pET expression hosts are lysogens of bacteriophage λDE3, as indicated by the (DE3) in their names and are suitable for production of protein from target genes cloned in pET vectors. The pLysS and pLysE designation is given to hosts carrying a pET-compatible plasmid that encodes T7 lysozyme, which is a natural inhibitor of T7 RNA polymerase. These strains are used to supress basal expression of T7 RNA polymerase prior to induction and thus stabilize pET recombinants encoding target proteins that affect cell growth and viability.

Strain	Size	Competent Cells Cat. No.	Glycerol Stock Cat. No.	Application
AD494(DE3)	0.2 ml		69020-3	Allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm.
	0.4 ml	69013-3		
	1.0 ml	69013-4		
AD494(DE3)pLysS	0.2 ml		69021-3	
	0.4 ml	69014-3		
	1.0 ml	69014-4		
B834(DE3)	0.2 ml		69288-3	Selenomethionine and ^{35}-S-met labeling
	0.4 ml	69041-3		
	1.0 ml	69041-4		
B834(DE3)pLysS	0.2 ml		69289-3	
	0.4 ml	69042-3		
	1.0 ml	69042-4		
BL21(DE3)	0.2 ml		69387-3	Protects target protein from *lon* and *ompT* proteases
	0.4 ml	69450-3		
	1.0 ml	69450-4		
HT96™ BL21(DE3)	1 plate	71012-3		
	4 plates	71012-4		
	20 plates	71012-5		
BL21(DE3) Singles™	11 rxn	70235-3		
	22 rxn	70235-4		
BL21(DE3)pLysS	0.2 ml		69388-3	
	0.4 ml	69451-3		
	1.0 ml	69451-4		
BL21(DE3)pLysS Singles	11 rxn	70236-3		
	22 rxn	70236-4		
B21(DE3)pLysE	0.2 ml		69389-3	
BL21*trxB*(DE3)	0.2 ml		70506-3	Allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm and protects target protein from *lon* and *ompT* proteases
	0.4 ml	70508-3		
	1.0 ml	70508-4		
BL21*trxB*(DE3)pLysS	0.2 ml		70507-3	
	0.4 ml	70509-3		
	1.0 ml	70509-4		
BLR(DE3)	0.2 ml		69208-3	A *recA*⁻ derivative of BL21 that may stabilize target plasmids containing repetitive sequences.
	0.4 ml	69053-3		
	1.0 ml	69053-4		
BLR(DE3)pLysS	0.2 ml		69209-3	
	0.4 ml	69056-3		
	1.0 ml	69056-4		
HMS174(DE3)	0.2 ml		69381-3	A K-12 *recA*⁻ strain that may stabilize target plasmids containing repetitive sequences
	0.4 ml	69453-3		
	1.0 ml	69453-4		
HMS174(DE3)pLysS	0.2 ml		69382-3	
	0.4 ml	69454-3		
	1.0 ml	69454-4		
HMS174(DE3)pLysE	0.2 ml		69393-3	

Strain	Size	Competent Cells Cat. No.	Glycerol Stock Cat. No.	Application
NovaBlue(DE3)	0.4 ml	69284-3		High stringency host with *recA endA-lacI*^{q} mutations. Recommended for use with the NovaTope-™ System
	1.0 ml	69284-4		
Origami™(DE3)	0.2 ml		70617-3	Allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm.
	0.4 ml	70627-3		
	1.0 ml	70627-4		
Origami(DE3) Singles	11 rxn	70630-3		
	22 rxn	70630-4		
Origami-(DE3)pLysS	0.2 ml		70618-3	
	0.4 ml	70628-3		
	1.0 ml	70628-4		
Origami(DE3)pLysS Singles	11 rxn	70631-3		
	22 rxn	70631-4		
Origami B-(DE3)	0.2 ml		70830-3	Allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm and protects target protein from *lon* and *ompT* proteases. A derivative of Tuner™ (*lacY1*) enabling low levels expression in all cells for solubility and activity enhancement.
	0.4 ml	70837-3		
	1.0 ml	70837-4		
Origami B(DE3)pLysS	0.2 ml		70832-3	
	0.4 ml	70839-3		
	1.0 ml	70839-4		
Rosetta™(DE3)	0.2 ml		70950-3	Enhances expression of proteins that contain codons rarely used in *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). A derivative of Tuner™ (*lacY1*) enabling low levels expression in all cells for solubility and activity enhancement.
	0.4 ml	70954-3		
	1.0 ml	70954-4		
Rosetta(DE3) Singles	11 rxn	71099-3		
	22 rxn	71099-4		
Rosetta(DE3)pLysS	0.2 ml		70951-3	
	0.4 ml	70956-3		
	1.0 ml	70956-4		
Rosetta(DE3)pLysS Singles	11 rxn	71100-3		
	22 rxn	71100-4		
Rosetta-gami™ (DE3)	0.2 ml		71062-3	Enhances expression of proteins that contain codons rarely used in *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). Allows disulfide bond formation in the *E. coli* cytoplasm.
	0.4 ml	71055-3		
	1.0 ml	71055-4		
Rosetta-gami(DE3)pLysS	0.2 ml		71064-3	
	0.4 ml	71057-3		
	1.0 ml	71057-4		
RosettaBlue™(DE3)	0.2 ml		71066-3	Enhances expression of proteins that contain codons rarely used in *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) and is a high stringency host with *recA*, *endA* and *lacI*^{q} mutations.
	0.4 ml	71059-3		
	1.0 ml	71059-4		
RosettaBlue(DE3)pLysS	0.2 ml		71068-3	
	0.4 ml	71034-3		
	1.0 ml	71034-4		
Tuner™(DE3)	0.2 ml		70612-3	Enables adjustable levels of expression in all cells due to the *lacY1* mutation; lower IPTG levels may enhance solubility and activity of the target protein.
	0.4 ml	70623-3		
	1.0 ml	70623-4		
Tuner(DE3)pLysS	0.2 ml		70613-3	
	0.4 ml	70624-3		
	1.0 ml	70624-4		

Isogenic Host Strains for Initial Cloning, Controls, and Expression

These host strains are isogenic with the λDE3 lysogens used for protein expression but lack a source of T7 RNA polymerase. These strains can be used for T7-based expression by infection with λ CE6, or for expression from *E. coli* promoters. Only the NovaBlue strain is recommended for initial cloning.

Strain	Size	Competent Cells Cat. No.	Glycerol Stock Cat. No.	Application
AD494	0.2 ml		69032-3	Allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplsm.
	0.4 ml	69033-3		
	1 ml	69033-4		
BL21	0.2 ml		69386-3	Protects target protein from *lon* and *ompT* proteases.
	0.4 ml	69449-3		
	1 ml	69449-4		
B834	0.2 ml		69287-3	Selenomethionine and ^{5}-S-met labeling
BLR	0.2 ml		69207-3	A *recA*$^{-}$ derivative of BL21 that may stabilize target plasmids containing repetitive sequences.
	0.4 ml	69052-3		
	1 ml	69052-4		
HMS174-	0.2 ml		69385-3	A *recA*$^{-}$ K-12 strain that may stailize traget plasmids containing repetitive sequences.
	0.4 ml	69452-3		
	1 ml	69452-4		
NovaBlue	0.2 ml		69009-3	High stringency host with the *recA*$^{-}$ *endA-lacI*^{q} mutations.
	0.4 ml	9825-3		
	1 ml	69825-4		
Origami™	0.2 ml		70616-3	Allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplsm.
	0.4 ml	70626-3		
	1 ml	70626-4		
Origami B	0.2 ml		70829-3	Allows disulfide bond formation in *E. coli* cytoplasm and protects target proteins from *lon* and *ompT*$^{-}$ proteases. A derivative of Tuner™ (*lacYI*) enabling low levels expression in all cells for solubility and activity enhancement.
	0.4 ml	70836-3		
	1 ml	70836-4		
Rosetta™	0.2 ml		70949-3	Enhances expression of proteins that contain codons rarely used in *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). A derivative of Tuner™ (*lacYI*) enabling low levels expression in all cells for solubility and activity enhancement.
	0.4ml	70953-3		
	1 ml	70953-4		
RosettaBlue™	0.2 ml		71065-3	Enhances expression of proteins that contain codons rarely used in *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA) and is a high stringency host with *recA*, *endA* and *lacI*^{q} mutations.
	0.4 ml	71058-3		
	1 ml	71058-4		
Rosetta-gami™	0.2 ml		71061-3	Enhances expression of proteins that contain codons rarely used in *E. coli* (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC, GGA). Allows disulfide bond formation in the *E. coli* cytoplasm.
	0.4 ml	71054-3		
	1 ml	71054-4		
Tuner™	0.2 ml		70611-3	Enables adjustable levels of expression in all cells due to the *lacY1* mutation; lower levels may enhance solubility and activity of the target protein.
	0.4ml	70622-3		
	1 ml	70622-4		

pET Host Strain Competent Cell Sets

The competent cell sets are for optimizing vector/host strain combinations.

Competent Cell Set	Size	Cat. No.	Strains
(DE3) Competent Cell Set	0.2 ml each	71032-3	AD494(DE3); BL21(DE3); BL21(DE3)*trxB*; BLR(DE3); HMS174-DE3); Origami™(DE3); Origami B(DE3); NovaBlue(DE3); Rosetta™(DE3); Tuner™(DE3)
(DE3)pLysS Competent Cell Set	0.2 ml each	71033-3	AD494(DE3)pLysS; BL21(DE3)pLysS; BL21(DE3)*trxB*pLysS; BLR(DE3)pLysS; HMS174(DE3)pLysS; Origami(DE3)pLysS; Origami B(DE3)pLysS; Rosetta(DE3)pLysS; Tuner(DE3)pLysS
AD494 Competent Cell Set	0.2 ml each	70231-3	AD494; AD494(DE3); AD494(DE3)pLysS
BL21 Competent Cell Set	0.2 ml each	70232-3	BL21; BL21(DE3); BL21(DE3)plysS
BLR Competent Cell Set	0.2 ml each	70233-3	BLR; BLR(DE3); BLR(DE3)pLysS
HMS174 Competent Cell Set	0.2 ml each	70234-3	HMS174; HMS174(DE3); HMS174(DE3)pLysS
Origami Competent Cell Set	0.2 ml each	70670-3	Origami; Origami(DE3); Origami(DE3)pLysS
Origami B Competent Cell Set	0.2 ml each	70911-3	Origami B; Orgami B;(DE3); Organi B(DE3)pLysS
Rosetta Competent Cell Set	0.2 ml each	70987-3	Rosetta; Rosetta(DE3); Rosetta(DE3)pLysS
RosettaBlue Competent Cell Set	0.2 ml each	71079-3	RosettaBlue; RosettaBlue(DE3); RosettaBlue(DE3)pLysS
Rosetta-gami Competent Cell Set	0.2 ml each	71080-3	Rosetta-gami; Rosetta-gami(DE3); Rosetta-gami(DE3)pLysS
Tuner™ Competent Cell Set	0.2 ml each	70726-3	Tuner; Tuner(DE3); Tuner(DE3)pLysS

pET System Lambda Phages

Lambda Phage	Size	Cat. No.	Application
Bacteriophage CE6	0.2 ml 10 ml	69390-3 69390-4	A recombinant phage used to provide a source of T7 RNA Polymerase to suseptible host cells carrying pET plsmids.
λDE3 Lysogenization Kit	10 rxn	69734-3	Designed for integration of λDE3 prophage *into E. coli* host cell chromosome such that the lysogenized host can be used to express target genes cloned in pET vectors.
λDE3 Lysogenization Kit plus pLysS & pLysE	10 rxn	69725-3	

平成15年7月23日発行　発行所　メルク株式会社　〒153-8927　東京都目黒区下目黒1-8-1　アルコタワー5F　VPJ03-0307-5000

メルク株式会社

東京本社　試薬・ライフサイエンス事業部
〒153-8927
東京都目黒区下目黒1-8-1　アルコタワー5F
Tel:03-5434-4722 / Fax:03-5434-5076

大阪支店
〒541-0045
大阪市中央区道修町2-6-7　錦江ビル
Tel:06-6202-3459 / Fax:06-6222-2487

フリーダイヤル/Eメール
Tel:0120-189-390 / Fax:0120-189-350
E-mail:service@merck.co.jp
http://www.merck.co.jp

平成15年7月23日発行　　発行所　メルク株式会社